

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 640**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

A61K 101/02 (2006.01)

C07B 59/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2012 PCT/US2012/027168**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12118909**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2012 E 12709216 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2680889**

54 Título: **Análogos de octreotato radiomarcados como trazadores de PET**

30 Prioridad:

01.03.2011 US 201161447785 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.03.2020

73 Titular/es:

GE HEALTHCARE LIMITED (50.0%)

Amersham Place

Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA , GB y

IMPERIAL COLLEGE (50.0%)

72 Inventor/es:

LUTHRA, SAJINDER KAUR;

LEYTON, JULIUS;

ABOAGYE, ERIC OFORI;

IDDON, LISA;

INDREVOLL, BARD;

GLASER, MATTHIAS EBERHARD y

CUTHBERTSON, ALAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 749 640 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos de octreotato radiomarcados como trazadores de PET

Campo de la invención

La presente invención describe uno o más nuevos radiotrazadores para tomografía de emisión de positrones (PET); específicamente imágenes de tumores neuroendocrinos, incluidos tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos. Específicamente, la presente invención describe nuevos análogos de [¹⁸F]Fluoroetilriazol-[Tyr³]Octreotato. Los radiotrazadores de la presente invención pueden estar dirigidos a receptores de somatostatina encontrados en la superficie celular de tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos. La presente invención también describe uno o más intermedios, precursores, composiciones farmacéuticas, procedimientos de fabricación y procedimientos de uso de los nuevos radiotrazadores.

Descripción de la técnica relacionada

La PET se está volviendo cada vez más importante para la detección temprana de enfermedades en oncología y neurología. Los péptidos radiomarcados, en particular, se están investigando con mayor frecuencia para detectar enfermedades, la monitorización del tratamiento y en la radioterapia con receptor de péptidos (PRRT) (Chen, X. Y., y col., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2004, 31, (8), 1081-1089; Lei, M., y col., *Current Medical Imaging Reviews* 6, (1), 33-41).

El péptido [Tyr³]octreotato (TOCA) (Figura 1) se ha marcado previamente con varios radioisótopos con el fin de obtener imágenes (Nikolopoulou, A., y col., *Journal of Peptide Science* 2006, 12, 124-131; Li, W. P., y col., *Bioconjugate Chemistry* 2002, 13, 721-728; Reubi, J. C., y col., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2000, 27, (3), 273-282) y PRRT de tumores neuroendocrinos (Teunissen, J., y col., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2009, 36, (11), 1758-1766). [Tyr³]octreotato es un análogo de somatostatina que tiene una semivida biológica más larga (1,5-2 horas) que la somatostatina y retiene la especificidad del receptor (Weiner, R. E., y col., *Seminars in Nuclear Medicine* 2001, 31, (4), 296-311). Se ha descubierto que los receptores de somatostatina, de los cuales hay 5 subtipos (sstr 1-5), se sobreexpresan en la superficie de los tumores neuroendocrinos (Rufini, V., y col., *Seminars in Nuclear Medicine* 2006, 36, (3), 228-247). Esta sobreexpresión permite la selección selectiva de tumores con un análogo de octreotato radiomarcado. El primer péptido secuenciado de ocho aminoácidos que se ha descubierto que imita a la somatostatina fue la octreotida. Se descubrió que el octapéptido cíclico contenía los sitios importantes para la unión al receptor de somatostatina y se usó inicialmente como un antagonista de los opiáceos (Maurer, R., y col., *PNAS* 1982, 79, 4815-4817) para el tratamiento de afecciones dolorosas, tales como la pancreatitis aguda y crónica (Uhl, W., y col., *Digestion, International Journal of Gastroenterology* 1999, 60, 23-31). Comparando la octreotida con [Tyr³]octreotato, se ha demostrado que este último tiene una mayor afinidad por los receptores de somatostatina (Reubi, J. C., y col., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2000, 27, (3), 273-282; Wild, R., y col., *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 2003, 30, (10), 1338-1347); parece que la sustitución de la tirosina y la treoninol por fenilalanina en el extremo C aumenta la afinidad. Sin embargo, [¹¹¹In]-DTPA-octreotida (Octreoscan™) sigue siendo el péptido de elección en la clínica y fue aprobado por la FDA como agente de imagen para tumores neuroendocrinos positivos para el receptor de somatostatina en 1994 (Rufini, V., y col., *Seminars in Nuclear Medicine* 2006, 36, (3), 228-247).

El uso de grupos prostéticos (es decir, pequeñas moléculas orgánicas radiomarcadas que luego se pueden acoplar al principal farmacóforo de interés) es la estrategia generalmente empleada al marcar péptidos u otras macromoléculas para superar las limitaciones del ¹⁸F, tal como la basicidad y la poca reactividad (Okarvi, S. M., *European Journal of Nuclear Medicine* 2001, 28, (7), 929-38). Los enfoques utilizados hasta la fecha varían en la cantidad de etapas implicadas, el tiempo de reacción general, el rendimiento aislado y procedimiento de aislamiento. La octreotida se ha marcado previamente marcado con grupos prostéticos orgánicos modificados con ¹⁸F. La estrategia inicial empleada por Hostetler y col. (*Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 1999, 42, S720-S721) era marcar directamente el extremo N-terminal de la octreotida con el éster activado de ácido [¹⁸F]fluorobenzoico ([¹⁸F] FBA). Los estudios de biodistribución posteriores mostraron que el análogo de [¹⁸F]fluorobenzoil-octreotida era demasiado lipófilo y mostraba una absorción significativa en el hígado. La octreotida también se ha marcado directamente en el extremo N con 2-[¹⁸F]fluoropropionato 4-nitrofeniléster, que en sí implica tres etapas de modificación química para sintetizar (Guhlke, S., y col., *Applied Radiation and Isotopes* 1994, 45, (6), 715-727). El principal inconveniente de esta química es la necesidad de proteger con Boc la cadena lateral de lisina de octreotida durante la conjugación que requiere la eliminación en la etapa final (Guhlke, S., y col., *Nuclear Medicine and Biology* 1994, 21, (6), 819-825).

Schottelius y col., (*Clinical Cancer Research* 2004, 10, (11), 3593-3606) querían desarrollar un análogo de octreotato marcado con ¹⁸F con una mejor absorción tumoral y una mejor farmacocinética en comparación con análogos anteriores. Los autores optaron por modificar el octreotato con grupos de carbohidratos para reducir la lipofilia, para reducir en consecuencia la eliminación hepática y, por el contrario, ayudar a la eliminación renal. Se desarrolló un octreotato modificado con glucosa (Gluc-Lys-TOCA) y la lisina del péptido se marcó con 2-[¹⁸F]fluoropropionato-4-nitrofeniléster. El producto final Gluc-Lys([¹⁸F]FP)-TOCA lo evaluó en pacientes Meisetschläger y col., (*Journal of Nuclear Medicine* 2006, 47, 566-573) y se descubrió que era superior a [¹¹¹In]-DTPA-octreotida en la detección de tumores neuroendocrinos. Sin embargo, mientras que [¹¹¹In]-DTPA-octreotida mostraba mejoras en la absorción

tumoral, el largo tiempo de síntesis (3 horas) y los bajos rendimientos (20-30 %) lo convirtieron en una opción no viable para el uso clínico de rutina (Meisetschläger, G., y col., of Nuclear Medicine 2006, 47, 566-573). Schottelius y col., (Clinical Cancer Research 2004, 10, (11), 3593-3606) también marcaron otros dos análogos de carbohidratos, Cel-S-Dpr-[Tyr³]octreotato y Gluc-S-Dpr[Tyr³]octreotato con [¹⁸F]fluorobenzaldehído para dar los radiotrazadores derivados de oxima. El Cel-S-Dpr([¹⁸F]FBOA)-[Tyr³]octreotato mostró una absorción tumoral mejorada en comparación con Gluc-Lys([¹⁸F]FP)-TOCA y tuvo un tiempo de síntesis más corto (50 min) con rendimientos mejorados (65- 85 %). El Gluc-S-Dpr[Tyr³]octreotato se marcó con [¹⁸F]fluoropropionato ([¹⁸F]FP) y [¹⁸F]fluorobenzaldehído ([¹⁸F]FBOA). El análogo de Gluc-S-Dpr-([¹⁸F]FP) -Tyr³]octreotato marcado mostró una absorción tumoral similar a Gluc-Lys([¹⁸F]FP)-TOCA, pero también tenía una alta proporción de tumor:órgano (sangre, hígado y músculo). El Gluc-S-Dpr-([¹⁸F]FBOA)[Tyr³]octreotato mostró una captación tumoral comparable a la del Cel-S-Dpr([¹⁸F]FBOA)-[Tyr³]octreotato, pero tenía una alta relación tumor/músculo.

Schirrmacher R. y col. (Tetrahedron Letters 52 (2011) 1973-1976) proponen marcar el péptido TATE con [¹⁸F]fluoro-2-hidroxipropil)benzaldehído. Schirrmacher R. y col. (Angew. Chem. Int. Ed. 2006 45, 6047-6050) han marado el Tyr³-octreotato con un grupo de ¹⁸F-silicio.

El análogo de octreotida marcado con ¹⁸F publicado más recientemente fue fluoruro de [¹⁸F]-aluminio-ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético ([¹⁸F] AIF-NOTA-octreotida) (Laverman, P., y col., Journal of Nuclear Medicine 51, (3), 454-461). La ventaja de utilizar la estrategia de marcaje de fluoruro de [¹⁸F]-aluminio es que no se requiere la etapa de secado azeotrópico con flúor-18, lo que significa tiempos de reacción generales más cortos. Mediante HPLC, el producto se observó como dos isómeros, equivalente a aproximadamente el 50 % de incorporación de [¹⁸F]AIF en el quelato NOTA, el resto se declaró como [¹⁸F]AIF no quelado. Los autores comentaron que los dos isómeros podrían separarse por HPLC. Cuando se volvieron a analizar, vieron un reequilibrio en los dos isómeros. La conformación de estos dos isómeros no se ha establecido hasta la fecha.

Se ha utilizado química Click previamente en el marcaje con flúor-18 de péptidos (Li, Z. B., y col., Bioconjugate Chemistry 2007, (18), 1987-1994; Ramenda, T., y col., Chemical Communications 2009, 48, 7521-7523; Hausner y col., J. Med. Chem, 2008, 5901; Mamat y col., Mini-Rev. Org. Chem. 2009, 6, 21). Dado que la reacción es eficiente, se puede aplicar a la síntesis de trazadores y ligandos radiomarcados con isótopos de corta duración (semivida ¹⁸F, 109,7 min) para tomografía de emisión de positrones (PET) (Glaser, M. y Arstad, E., Bioconjugate Chemistry 2007, 18, (3), 989-993; Glaser, M., y col., Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals 2009, 52, (9-10), 407-414).

Marik y Sutcliffe (Marik, J., y col., Tetrahedron Letters 2006, (47), 6681-6684) adoptó el enfoque de marcar alquinos terminales con flúor-18 y añadir el resto azida a varios péptidos. El CuSO₄/Na-ascorbato se empleó inicialmente como un sistema catalítico, pero el péptido marcado solo se aisló con un rendimiento del 10 %. Se observaron mejoras cuando el CuSO₄ fue reemplazado por CuI con la adición de W, W-diisopropiletilamina (DIPEA). Sirion y col. (Tetrahedron Letters 2007, 48, 3953-3957) descubrieron que el uso de CuI daba rastros del subproducto de triazol 1,5-sustituido. Los autores sintetizaron cuatro precursores de mesilato, dos acetileno y dos azidas, todos los cuales se marcaron usando [¹⁸F]TBAF, con tBuOH como disolvente (Kim, D. W., y col., Journal of the American Chemical Society 2006, 128, 16394-16397).

Sin embargo, todavía existe la necesidad en la técnica de análogos de octreotato radiomarcados con una mejor absorción del tumor y parámetros farmacocinéticos en comparación con análogos previamente marcados. También existe la necesidad de un procedimiento eficiente y efectivo para preparar tales análogos de octreotato radiomarcados. La presente invención, como se describe a continuación, responde a estas necesidades.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1** describe el péptido [Tyr³]octreotato (TOCA), cinco análogos de alquino (**1a-5a**) y triazol (**1b-5b**) octreotato y el control de alquino negativo mezclado (**6a**) y triazol (**6b**).

La **Figura 1a** representa la traza de HPLC semipreparativa de la mezcla de reacción para sintetizar **5b** que muestra los subproductos formados **11** y **12**. HPLC semipreparativa usando un Luna C18 100 X 10 mm 5 micrómetros, gradiente 25-50 % MeCN/H₂O 0,1 % de TFA. Traza superior: Canal de radiactividad **5b** (tiempo de retención 16,05 min). Traza inferior: Canal UV, λ 254 nm, los dos subproductos, **12** (tiempo de retención 14,27 min) y **11** (tiempo de retención 17,06 min).

La **figura 2** representa el análisis por HPLC de FET-G-PEG-TOCA (**1b**) llevado a cabo usando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

La **figura 3** representa el análisis por HPLC de FETE-PEG-TOCA (**2b**) llevado a cabo usando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

La **figura 4** representa el análisis por HPLC de FET-G-TOCA (**3b**) llevado a cabo usando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

La **figura 5** representa el análisis por HPLC de FETE-TOCA (**4b**) llevado a cabo usando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante

15 min.

La **figura 6** representa el análisis por HPLC de FET-βAG-TOCA (**5b**) llevado a cabo usando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

5 La **figura 7** representa el análisis por HPLC de FET-βAG- [W-c (CTFTYC) K] (**6b**) llevado a cabo usando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

10 La **figura 8** representa el análisis por HPLC de FET-G-PEG-TOCA (**1b**) enriquecido con patrones de [¹⁹F] llevado a cabo utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

La **figura 9** representa el análisis por HPLC de FETE-PEG-TOCA (**2b**) enriquecido con patrones de [¹⁹F] llevado a cabo utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

15 La **figura 10** representa el análisis por HPLC de FET-G-TOCA (**3b**) enriquecido con patrones de [¹⁹F] llevado a cabo utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

20 La **figura 11** representa el análisis por HPLC de FETE-TOCA (**4b**) enriquecido con patrones de [¹⁹F] llevado a cabo utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min. Este análogo parece mostrar signos de degradación a lo largo del tiempo, debido a que está almacenado en solución acuosa durante >1 mes; de ahí los dos picos. En la formación inicial, el [¹⁹F]FETE-TOCA se vió como un solo pico.

La **figura 12** representa el análisis por HPLC de FET-βAG-TOCA (**5b**) enriquecido con patrones de [¹⁹F] llevado a cabo utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

25 La **Figura 13** representa el análisis por HPLC de FET-βAG- [W-c (CTFTYC) K] (**6b**) enriquecido con patrones de [¹⁹F] llevado a cabo utilizando una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 μm; caudal 1 ml/min) usando un gradiente de 5-80 % ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min.

30 La **figura 14** representa los perfiles de afinidad de diferentes análogos de [¹⁸F]fluoroetil triazol- [Tyr³]octreotato para los subtipos de receptores de somatostatina sstr-2, 3 y 4 determinados usando un ensayo de lector de placa de imágenes fluorométricas de flujo de calcio (FLIPR) (véanse los Ejemplos). La activación del flujo de calcio por análogos de [¹⁸F]fluoroetil triazol-[Tyr³]octreotato en células que expresan sstr-2, 3 o 4- precargadas con un colorante de calcio se evaluó a diferentes concentraciones; el ensayo se realizó por duplicado. La salida de fluorescencia se midió y los datos se expresaron como el % de la señal de fluorescencia máxima. Se resume la activación del receptor semimáxima para los diversos ligandos agonistas. ND = no determinado debido a la falta de actividad.

35 **Figura 15.** RadioHPLC cromatografía de [¹⁸F]-FET-βAG-TOCA. (a) Patrón de referencia que muestra el tiempo de retención de analito a 8,47 min y (b) extracto de plasma típico obtenido 30 min después de la inyección del radiotrazador en ratones, lo que indica un radiotrazador estable.

40 **Figura 16.** Imágenes PET-CT que muestran la localización de (a) [¹⁸F]-FET-βAG-TOCA y (b) el péptido mezclado FET-βAG- [W-c (CTFTYC) K] de tumores de riñón y vejiga de ratones portadores del tumor AR42J. Se muestran imágenes estáticas transversales y sagitales (30-60 min; fusionadas, 0,5 mm de corte).

45 **Figura 17.** Curvas de la actividad en el tiempo de comparación de la farmacocinética tisular de análogos de [¹⁸F]fluoroetil triazol-[Tyr³]octreotato en tumor AR42J riñón, hígado, músculo y orina. Se realizaron imágenes dinámicas de PET/TC durante 60 minutos después de la inyección i.v. de cada radiotrazador en ratones portadores de tumor. Para mayor claridad, las curvas del hígado se han ampliado (zoom). Los valores de absorción de radiotrazador de tejido se expresan como el % de la dosis inyectada/ml de tejido. Los valores representan la media ± SEM (n = 3-5); las barras superior e inferior se utilizan para mayor claridad. Los símbolos son (□) FET-G-PEG-TOCA, (○) FETE-PEG-TOCA, (●) FET-βAG-TOCA, (■) FET-G-TOCA y (▲) FETE-TOCA.

50 **Figura 18.** Especificidad de la localización de FET-βAG-TOCA en el modelo de xenoinjerto AR42J. Se muestra la cinética de [¹⁸F]-FET-βAG-TOCA y el efecto de saturar los sitios de unión al receptor con un exceso de octreotida fría no marcada. Los estudios de bloqueo se llevaron a cabo inyectando octreotida (10 mg/kg; i.v.) 10 min antes de la inyección i.v. de [¹⁸F]-FET-βAG-TOCA. La imagen dinámica se realizó durante 60 min. Los valores de absorción de radiotrazador de tejido se expresan como el % de la dosis inyectada/ml de tejido. Los gráficos también ilustran la farmacocinética del péptido mezclado, FET-βAG- [W-c (CTFTYC) K] en el mismo modelo de ratón. Los valores representan la media ± SEM (n = 3-5); las barras superior e inferior se utilizan para mayor claridad. Los símbolos son (●) FET-βAG-TOCA en ratones no expuestos anteriormente a octreotida, (▲) FET-βAG-TOCA en ratones a los que se ha administrado previamente 10 mg/kg de octreotida sin marcar y (■) FET-βAG- [W-c (CTFTYC) K] en ratones no expuestos anteriormente a octreotida.

Sumario de la invención

60 Los aspectos de la presente invención se exponen en las reivindicaciones independientes.

La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol.

TLa presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetil triazol. Un compuesto de

la presente invención combina una alta unión específica con una localización rápida del objetivo y una farmacocinética rápida para obtener imágenes PET de alto contraste.

Se desvela un procedimiento para preparar un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetil triazol de la invención.

- 5 También se desvela un procedimiento de formación de imágenes usando un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetil triazol de la invención.

La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino. Se describe un procedimiento para preparar el mismo.

- 10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende al menos un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetil triazol de la invención junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo biocompatible.

La presente divulgación describe la detección del receptor de somatostatina *in vitro* o *in vivo* que comprende administrar un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetil triazol usando de la invención o una composición farmacéutica del mismo.

- 15 También se describe un procedimiento de detección del receptor de somatostatina *in vitro* o *in vivo* usando un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetil triazol de la invención o una composición farmacéutica del mismo.

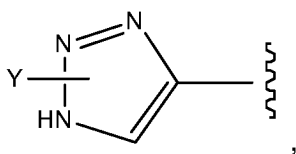
Descripción detallada de la invención

La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol de la fórmula (I):

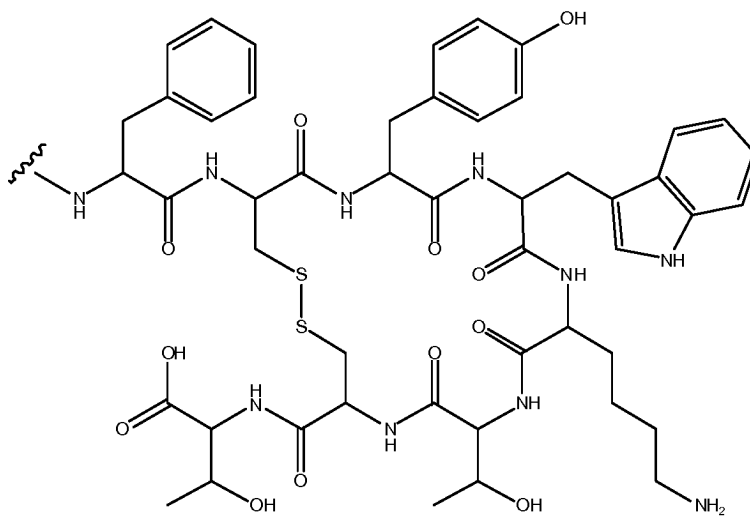


- 20 en la que:

R₁ es



en la que Y es un resto indicador que contiene al menos un radioisótopo; R₂ tiene la estructura siguiente:



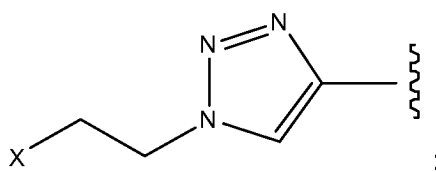
- 25 y ENLAZADOR es un grupo enlazador como se describe en el documento WO2008139207 o un grupo enlazador sintético de fórmula -(A)_m- en la que cada A es independientemente -CR_r, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NR₂CR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂ o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, un aminoácido, un bloque componente de azúcar o polietilenglicol (PEG) monodisperso; cada R se elige independientemente de H, alquilo C₁₋₂₀, alqueno C₂₋₄, alquino C₂₋₄, alclxi C₁₋₄alquilo C₁₋₂₀ hidroxialquilo C₁₋₂₀; m es un número entero de 1 a 20.
- 30

De acuerdo con la divulgación, el radioisótopo del resto indicador Y puede ser cualquier radioisótopo conocido en la técnica. En un ejemplo, el radioisótopo es cualquier radioisótopo PET conocido en la técnica (por ejemplo, ^{18}F , ^{17}Br , ^{76}Br , ^{124}I , ^{11}C , ^{82}Rb , ^{68}Ga , ^{64}Cu y ^{62}Cu ; preferentemente, ^{11}C o ^{18}F ; más preferentemente, ^{18}F). En un ejemplo, el radioisótopo es cualquier radioisótopo de SPECT conocido en la técnica (por ejemplo, ^{123}I , ^{124}I , ^{131}I). El radioisótopo puede incorporarse directamente en el resto informador Y (por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{18}\text{F}$ o $-\text{CH}_2\text{CH}_2^{11}\text{CH}_2\text{F}$) o puede incorporarse a un agente quelante por procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/067376).

La presente divulgación proporciona un análogo de $[\text{Tyr}^3]\text{octreotato}$ unido a 2-fluoroetiltriazol de Fórmula (II):

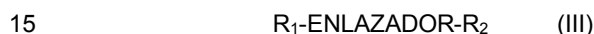


10 en la que: R_1 es



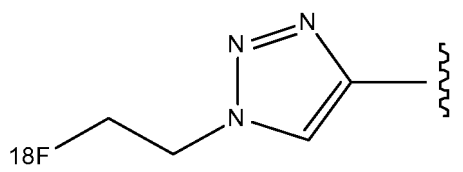
en la que X es un radioisótopo como se ha descrito anteriormente y en la que ENLAZADOR y R_2 son cada uno como se describe para la Fórmula (I).

La presente divulgación proporciona un análogo de $[\text{Tyr}^3]\text{octreotato}$ unido a 2- ^{18}F -fluoroetiltriazol de Fórmula (III):

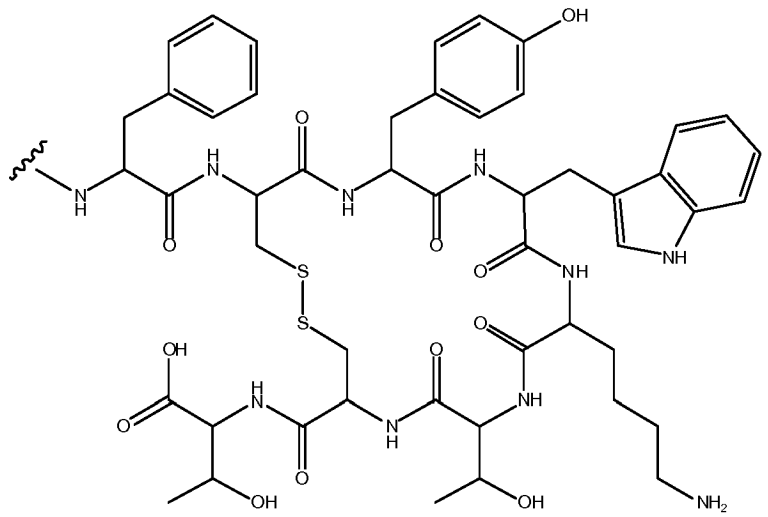


en la que:

R_1 es

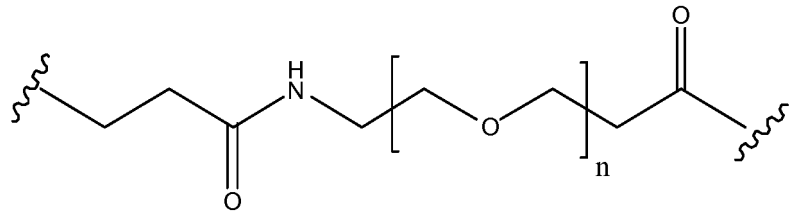
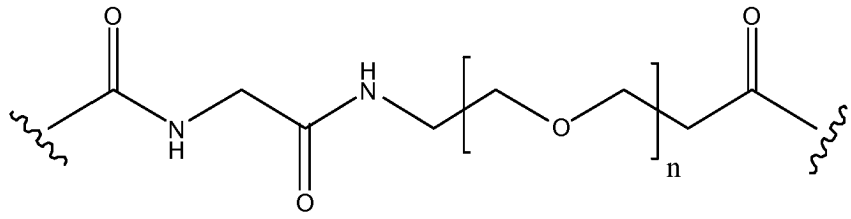


R_2 tiene la estructura siguiente:

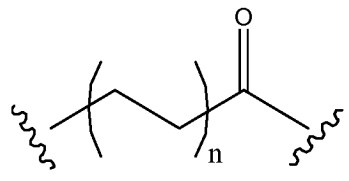
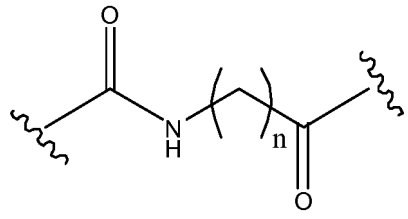


20 y ENLAZADOR es un grupo enlazador como se describe en el documento WO2008139207 o un grupo enlazador sintético de fórmula $-(\text{A})_m-$ en la que cada A es independientemente $-\text{CR}_r$, $-\text{CR}=\text{CR}$, $-\text{C}\equiv\text{C}$, $-\text{CR}_2\text{CO}_2$, $-\text{CO}_2\text{CR}_2$, $-\text{NRCO}$, $-\text{CONR}$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{O})\text{NR}$, $-\text{NR}(\text{C}=\text{S})\text{NR}$, $-\text{SO}_2\text{NR}$, $-\text{NRSO}_2$, $-\text{CR}_2\text{OCR}_2$, $-\text{CR}_2\text{SCR}_2$, $-\text{CR}_2\text{NRCR}_2$, un grupo cicloheteroalquileo C_{4-8} , un grupo cicloalquileo C_{4-8} , un grupo arileno C_{5-12} o un grupo heteroarileno C_{3-12} , un aminoácido, un bloque componente de azúcar o polietilenglicol (PEG) monodisperso; cada R se elige independientemente de H, alquilo C_{1-20} , alqueno C_{2-4} , alquino C_{2-4} , alclxi C_{1-4} alquilo C_{1-20} hidroxialquilo C_{1-20} ; m es un número entero de 1 a 20.

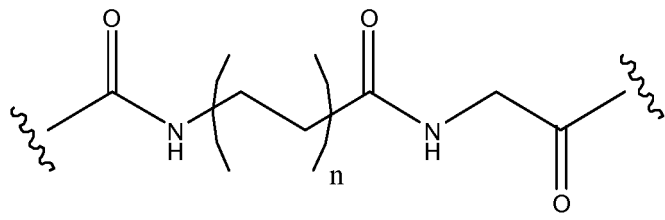
La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol de la fórmula (I), (II) y/o (III), cada uno como se ha descrito anteriormente, en la que R₁ y R₂ son cada uno como se ha descrito anteriormente para las fórmulas (I), (II) y (III) y ENLAZADOR es -(polietilenglicol)_n;



5

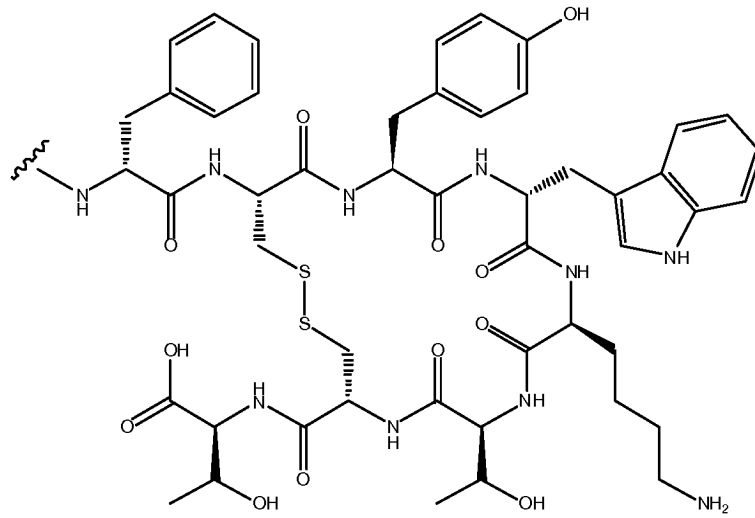


o

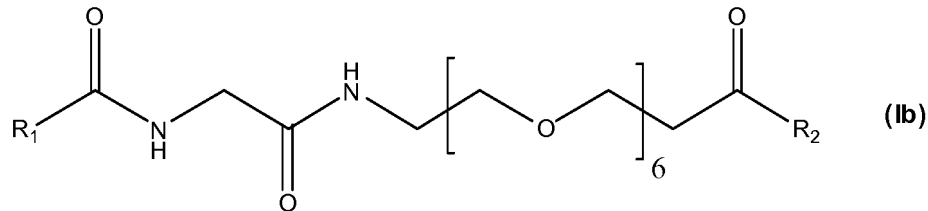


10 en la que n es un número entero de 1-20; preferentemente, n es un número entero de 1-10; más preferentemente, n es un número entero de 1-6.

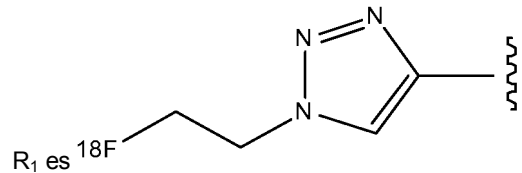
En un ejemplo, el compuesto R₂ de las fórmulas (I), (II) y (III) cada uno como se ha descrito anteriormente es:



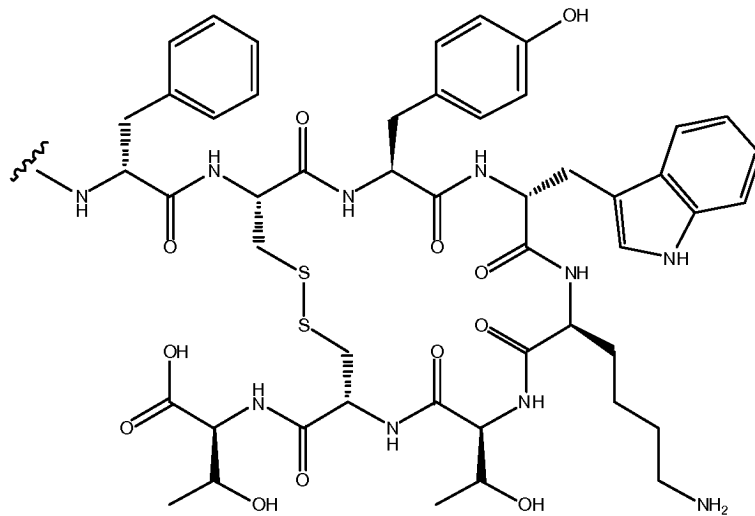
La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, FET-G-PEG-TOCA, de Fórmula (1b):



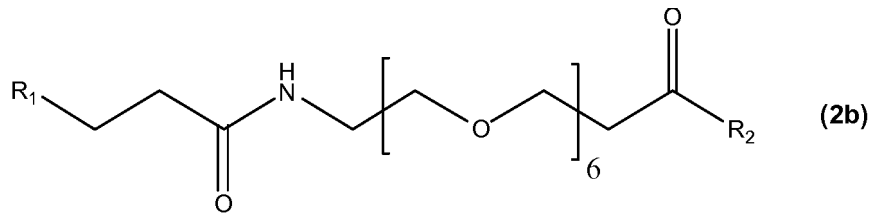
5 en la que:



y R₂ tiene la estructura siguiente:

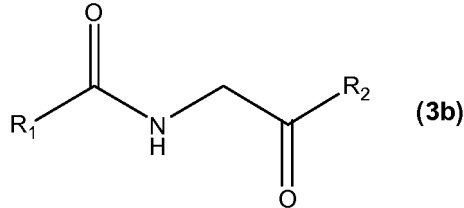


10 La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, FETE-PEG-TOCA, de Fórmula (2b):



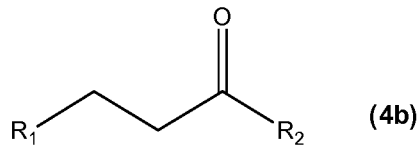
en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula **(1b)**.

La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, FET-G-TOCA **(3b)**:



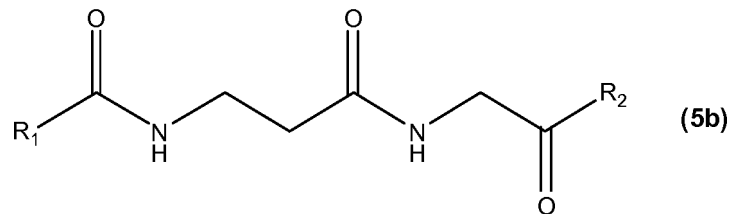
5 en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula **(1b)**.

La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, FETE-TOCA **(4b)**:



en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula **(1b)**.

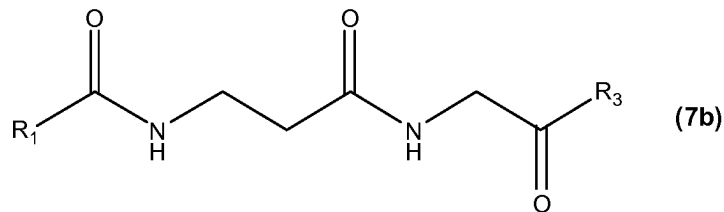
La presente invención proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, FET-βAG-TOCA **(5b)**:



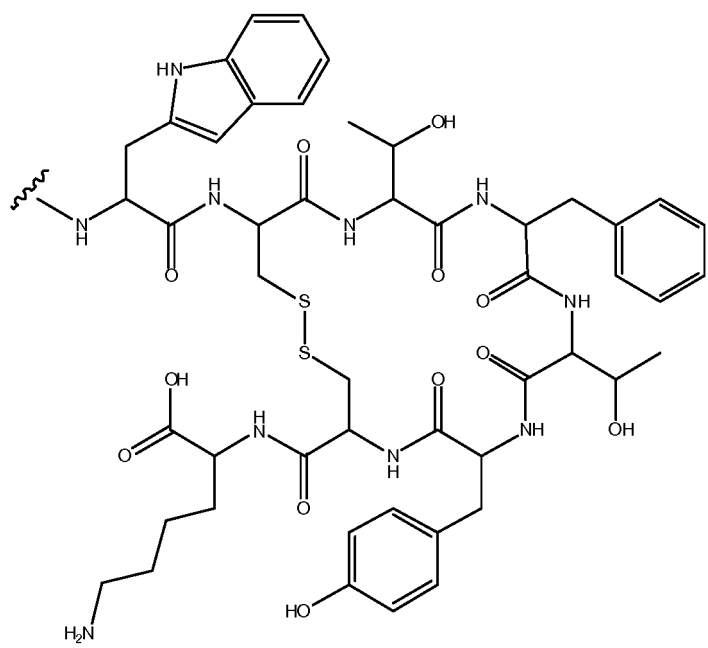
10

en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula **(1b)**.

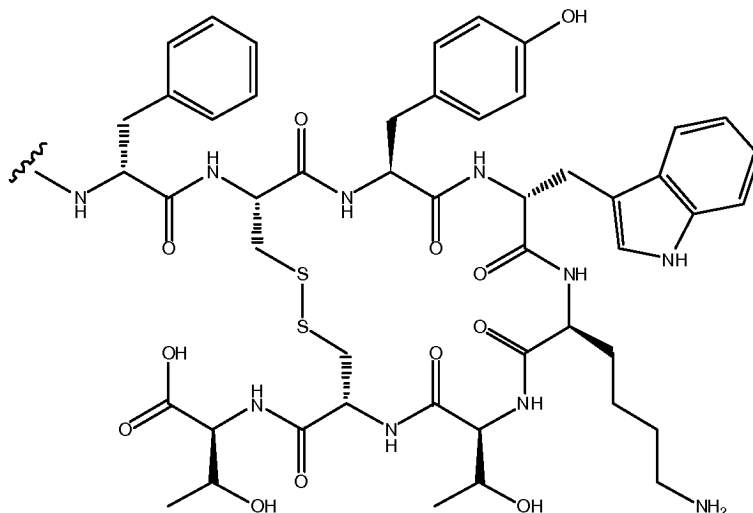
La presente divulgación también proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, FET-βAG-[W-c-(CTFTYC)K] **(7b)**:



15 en la que R₁ es como se ha descrito anteriormente para el compuesto de Fórmula **(1b)** y R₃ es:



preferentemente, R₃ tiene la estructura siguiente:



Composición farmacéutica o radiofarmacéutica

5 La presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende al menos un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol o un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención, tal como se describe en el presente documento, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo biocompatible.

10 La presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende al menos un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol o un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención, tal como se describe en el presente documento, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo biocompatible adecuado para la administración a mamíferos.

15 Como comprenderá un experto en la técnica, el vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo biocompatible puede ser cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo biocompatible conocidos en la técnica.

20 El "vehículo farmacéuticamente aceptable, excipiente o vehículo biocompatible "puede ser cualquier fluido, especialmente un líquido, en el que se puede suspender o disolver un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol o un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención, tal que la composición farmacéutica es fisiológicamente tolerable, por ejemplo, puede administrarse al cuerpo de los mamíferos sin toxicidad o molestias indebidas. El vehículo biocompatible es adecuadamente un vehículo líquido inyectable tal como agua para inyección

apirógena estéril; una solución acuosa, tal como solución salina (que puede equilibrarse ventajosamente para que el producto final para inyección sea isotónico o no hipotónico); una solución acuosa de una o más sustancias que ajustan la tonicidad (por ejemplo, sales de cationes plasmáticos con contraiones biocompatibles), azúcares (por ejemplo, glucosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (por ejemplo, sorbitol o manitol), glicoles (por ejemplo, glicerol) u otros materiales de poliol no iónicos (por ejemplo, polietilenglicoles, propilenglicoles y similares). El vehículo biocompatible también puede comprender disolventes orgánicos biocompatibles tales como etanol. Tales disolventes orgánicos son útiles para solubilizar más compuestos o formulaciones lipofílicas. Preferentemente, el vehículo biocompatible es agua para inyección apirógena, solución salina isotónica o una solución acuosa de etanol. El pH del vehículo biocompatible para inyección intravenosa está adecuadamente en el intervalo de 4,0 a 10,5.

Una composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía parenteral, es decir, por inyección, y es, más preferentemente, una solución acuosa. Dicha composición puede contener opcionalmente ingredientes adicionales, tales como tampones; solubilizantes farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, ciclodextrinas o tensioactivos como Pluronic, Tween o fosfolípidos); estabilizantes o antioxidantes farmacéuticamente aceptables (tales como ácido ascórbico, ácido gentísico o ácido para-aminobenzoico). Un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica de la invención puede comprender además las etapas necesarias para obtener una composición farmacéutica que comprende un compuesto radiomarcado, por ejemplo, eliminación de disolvente orgánico, adición de un tampón biocompatible y cualquier otro ingrediente opcional. Para la administración parenteral, también deben tomarse medidas para garantizar que la composición farmacéutica de la invención sea estéril y apirógena. Dichas etapas son bien conocidas por los expertos en la técnica.

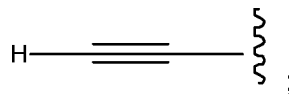
20 Intermedios

La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino de la fórmula (IV):

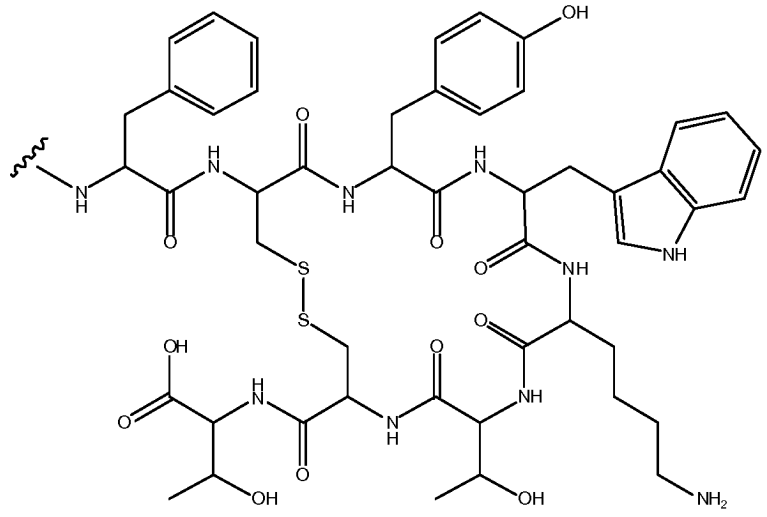


en la que:

R₁ es

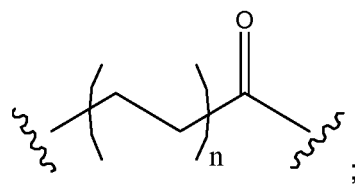
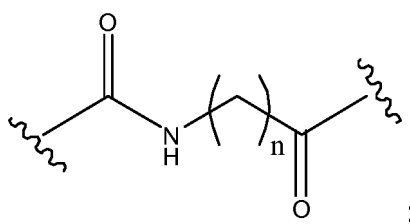
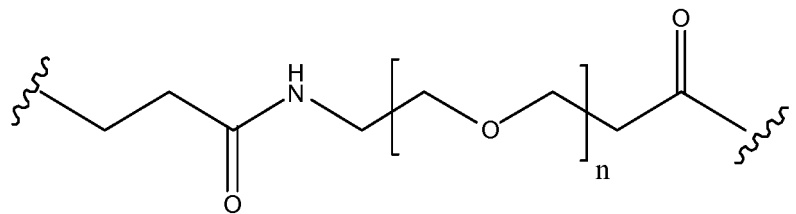
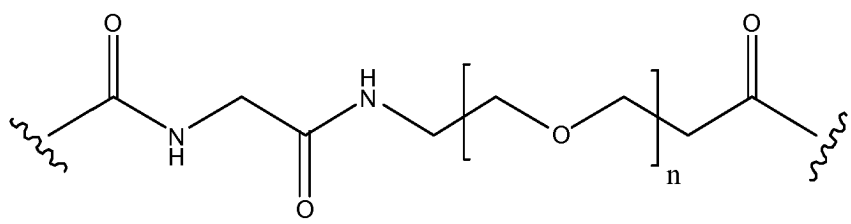


R₂ tiene la estructura siguiente:

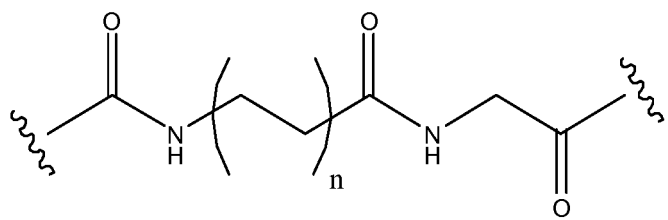


y ENLAZADOR es un grupo enlazador como se describe en el documento WO2008139207 o un grupo enlazador sintético de fórmula -(A)_m- en la que cada A es independientemente -CR_r, -CR=CR-, -C≡C-, -CR₂CO₂-, -CO₂CR₂-, -NRCO-, -CONR-, -NR(C=O)NR-, -NR(C=S)NR-, -SO₂NR-, -NRSO₂-, -CR₂OCR₂-, -CR₂SCR₂-, -CR₂NRCR₂-, un grupo cicloheteroalquileo C₄₋₈, un grupo cicloalquileo C₄₋₈, un grupo arileno C₅₋₁₂ o un grupo heteroarileno C₃₋₁₂, un aminoácido, un bloque componente de azúcar o polietilenglicol (PEG) monodisperso; cada R se elige independientemente de H, alquilo C₁₋₂₀, alquenilo C₂₋₄, alquinilo C₂₋₄, alclxi C₁₋₄alquilo C₁₋₂₀o hidroxialquilo C₁₋₂₀; m es un número entero de 1 a 20.

La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino de Fórmula (IV) como se ha descrito anteriormente en la que R₁ y R₂ son cada uno como se ha descrito anteriormente para la Fórmula (IV) y ENLAZADOR es -(polietilenglicol)_n-;

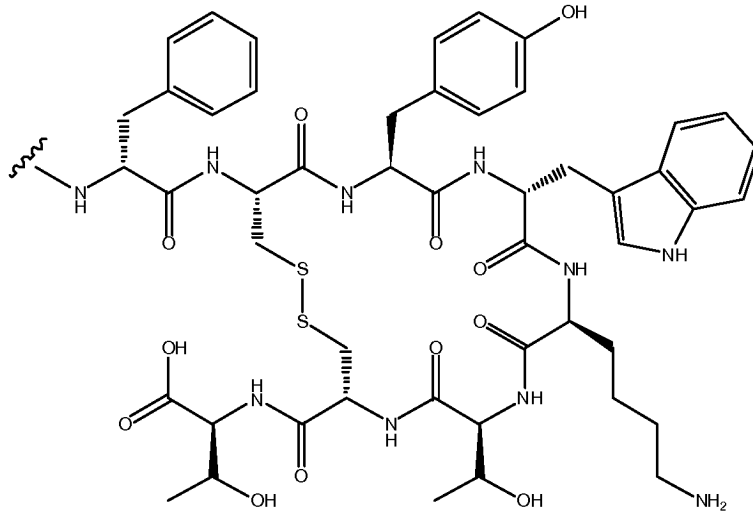


5 o

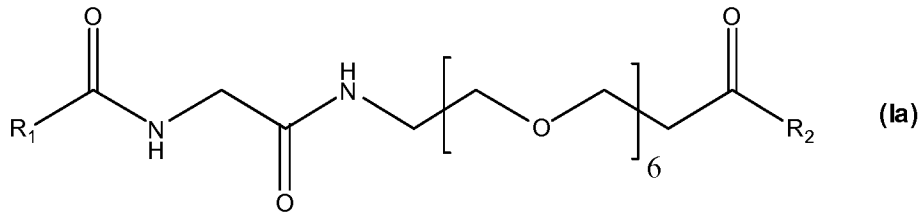


en la que n es un número entero de 1-20; preferentemente, n es un número entero de 1-10; más preferentemente, n es un número entero de 1-6.

En un ejemplo, el compuesto R₂ de Fórmula (IV) como se ha descrito anteriormente es:

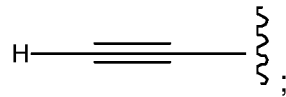


La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, G-PEG-TOCA, de Fórmula (Ia):



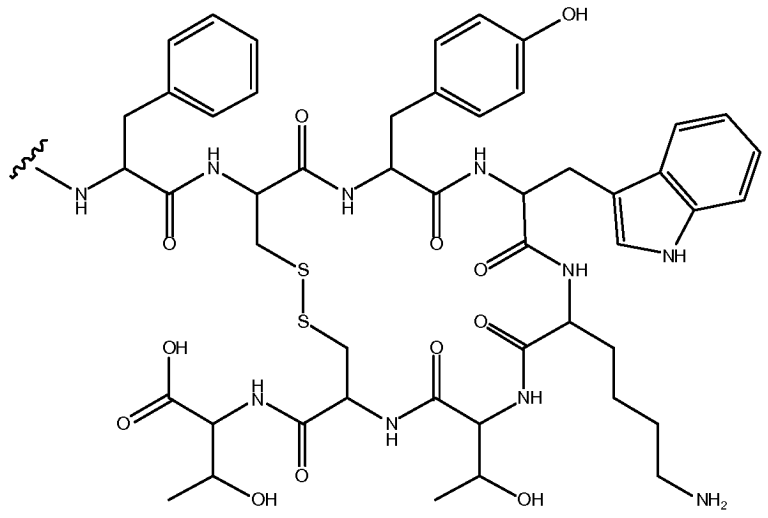
en la que:

5 R₁ es

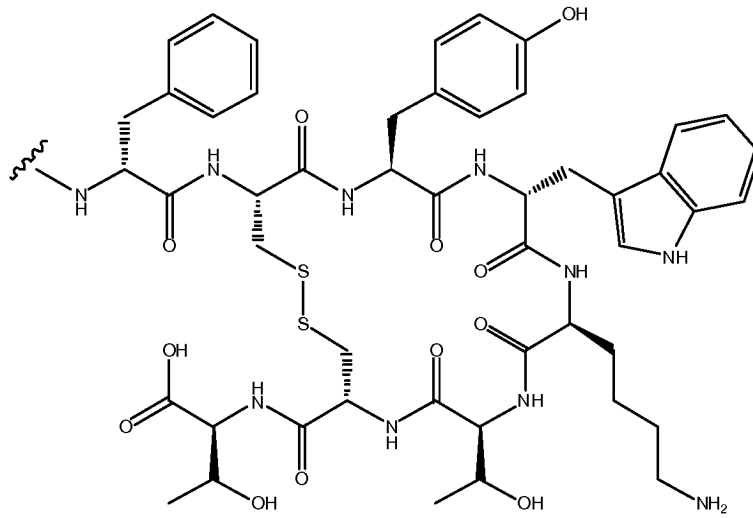


y

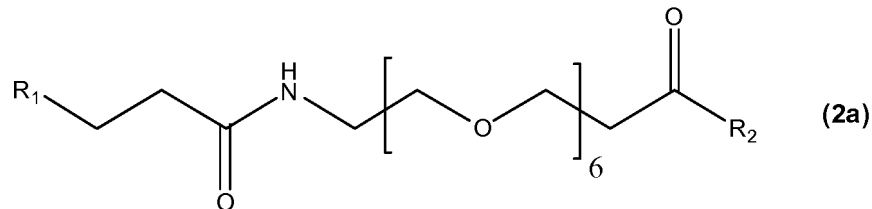
R₂ tiene la estructura siguiente:



10 preferentemente R₂ tiene la estructura siguiente:

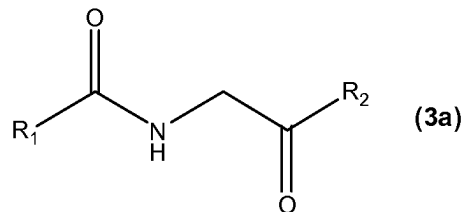


La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, E-PEG-TOCA, de fórmula (2a):



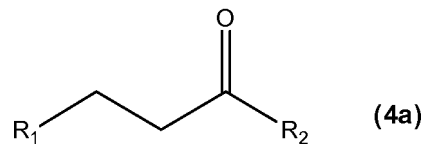
en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula (1a).

5 La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, G-TOCA (3a):



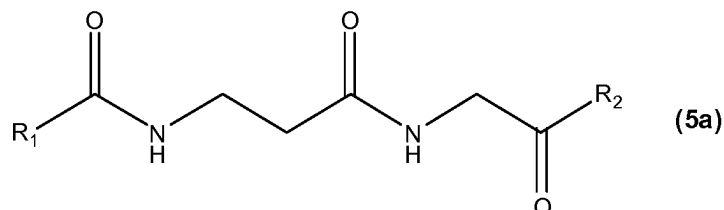
en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula (1a).

La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, E-TOCA (4a):



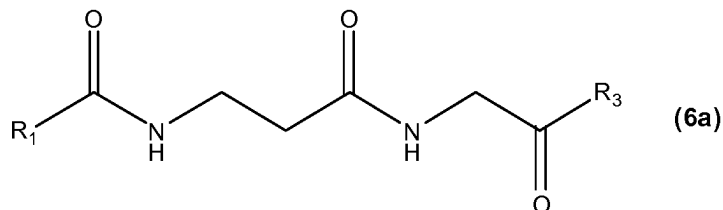
10 en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula (1a).

La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, βAG-TOCA (5a):

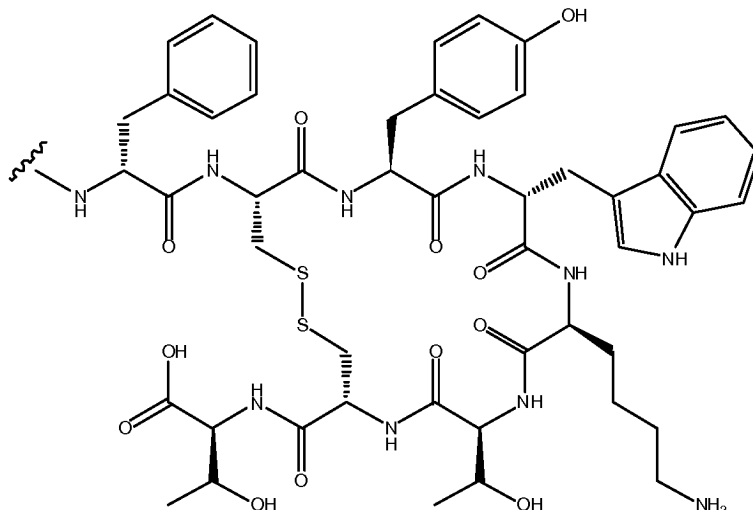


en la que R₁ y R₂ se ha descrito anteriormente cada uno para el compuesto de fórmula (1a).

La presente divulgación proporciona un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, βAG-[W-c-(CTFTYC)K] (**6a**):



en la que R₁ es como se ha descrito anteriormente para el compuesto de Fórmula (**1a**) y R₃ es:



5 Síntesis

Se puede preparar un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la presente invención y un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino de la presente invención por procedimientos conocidos en la técnica (documento WO2010/026388 y por los procedimientos que se ejemplifican a continuación.

- 10 La introducción de un radioisótopo de PET (es decir, cualquier radioisótopo emisor de positrones) como se describe en el presente documento puede introducirse en un compuesto de Fórmulas (I), (II), (III) y un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-fluoroetiltriazol antes de la formación del resto triazol o después de la formación del resto triazol por cualquier medio conocido en la técnica (por ejemplo, documento WO 2010/026388). Se puede introducir un radioisótopo de SPECT en una molécula de las fórmulas (I) o (II), cada uno como se describe en el presente documento, de la misma manera.
- 15 De acuerdo con la presente divulgación, un procedimiento de formación de un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la presente invención comprende la etapa de hacer reaccionar un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino con 2-[¹⁸F]Fluoroetilazida en condiciones de química clic catalizada con cobre para formar el correspondiente análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol, cada uno como se describe en el presente documento.
- 20 En una realización de la invención, a síntesis del análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol es automática. Los radiotrazadores [¹⁸F] pueden prepararse convenientemente de manera automatizada por medio de un aparato de radiosíntesis automatizado. Hay varios ejemplos disponibles comercialmente de tales aparatos, incluyendo Tracerlab™ y FASTlab™ (ambos de GE Healthcare Ltd.). Tal aparato comprende habitualmente un "casete", a menudo desechable, en el que se realiza la radioquímica, que se ajusta al aparato para realizar una radiosíntesis. El casete normalmente incluye vías de fluido, un recipiente de reacción y puertos para recibir viales de reactivos, así como cualquier cartucho de extracción en fase sólida utilizado en las etapas de limpieza posradiosintéticas.

Por lo tanto, la presente divulgación proporciona en otro aspecto un casete para la síntesis automatizada del radiotrazador de PET tal como se define en el presente documento, que comprende:

- 30 (i) un recipiente que contiene un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino, como se describe en el presente documento; y
- (ii) un recipiente que contiene una azida capaz de experimentar una reacción de química de clic con un análogo

de [Tyr³]octreotato unido a alquino del recipiente (iii) (por ejemplo, tosiletilazida en una solución de MeCN, DMSO o DMF); y

(iii) añadir los contenidos de dicho recipiente (ii) a una fuente adecuada de ¹⁸F.

5 De acuerdo con la presente divulgación, un casete de la presente invención puede, opcionalmente, comprender además uno o más de los siguientes:

(iv) un cartucho QMA;

(v) eluyente QMA para liberar el flúor-18 atrapado que consiste en K222, MeCN, agua y una base (por ejemplo, TBAHCO₃, K₂CO₃, Cs₂CO₃);

10 (vi) un recipiente que contiene un catalizador de cobre (por ejemplo, catalizador de cobre (I); sulfato de cobre en una solución acuosa);

(vii) un recipiente que contiene ascorbato de Na (preferentemente, en solución tampón de acetato de sodio a pH 5,0);

(viii) un recipiente que contiene un ligando estabilizador de cobre (I) (por ejemplo, BPDS);

(ix) una línea dirigida a un sistema HPLC; y

15 (ix) un cartucho de intercambio iónico para eliminar el exceso de ¹⁸F.

Ejemplos

Los reactivos y disolventes se adquirieron de Sigma-Aldrich Co. Ltd. (Gillingham, Reino Unido) y VWR International Ltd UK, y se usaron sin purificación adicional. BPDS (9) se adquirió e Pfaltz & Bauer Inc. Waterbury, EE.UU. [¹⁸F] - AIF-NOTA se sintetizó de acuerdo con Laverman P, y col., J Nucl Med. 2010;51:454-461. [⁶⁸Ga] -DOTATATE se adquirió en Covidien (Reino Unido) Commercial Ltd (Gosport, Reino Unido).

25 Se midió el MALDI-TOF en la London School of Pharmacy con un instrumento Finnigan LaserMat 2000. La HPLC analítica se llevó a cabo utilizando un instrumento Beckman Gold con el software Karat32 o el software Laura. El sistema de radio HPLC era un instrumento Beckman System Gold equipado con un detector y (Bioscan Flow-count). Una columna Phenomenex Luna C18 (2) (50 x 4,6 mm, 3 µm; caudal 1 ml/min) se usó para la HPLC analítica. Una columna semipreparativa (Phenomenex Luna C18, 100 x 10 mm, 5 µm, 110A; caudal de 3 ml/min) se usó para la purificación final de los péptidos. El siguiente sistema de fase móvil se utilizó para la HPLC analítica: disolvente A, agua/TFA (0,1 %); disolvente B, acetonitrilo/TFA (0,1 %); gradiente lineal de 5-80 % de disolvente ACN/TFA al 0,1 % durante 15 min. Los compuestos no radiactivos se purificaron usando una HPLC preparativa (Agilent1200, columna Phenomenex Luna C18 (2), 75 X30 mm, 5 µm, caudal 15 ml/min). Para separar las muestras para los cálculos de log D, se utilizó un aparato de centrifuga MSE Micro Centaur, Los recuentos gamma se llevaron a cabo utilizando un contador gamma Wallac 1282 Compugamma Universal y los resultados se registraron utilizando el software EdenTerm v1.2. Se produjo [¹⁸F]flúor mediante un ciclotrón (PET Trace, GE Medical systems) usando la reacción nuclear ¹⁸O(p,n)¹⁸F con irradiación de protones 16,4 MeV de una diana de [¹⁸O]H₂O enriquecida.

Abreviaturas:

ACN:	Acetonitrilo
DCM:	Diclorometano
DIPEA:	Diisopropiletilamina
Fmoc:	9-Fluorenilmetiloxycarbonilo
HBTU:	hexafluorofosfato de O-benzotriazol-1-il-N,N',N'-tetrametiluronio
HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
NMP:	1-metil-2-pirrolidinona
PyBOP:	(Benzotriazol-1-iloxi)hexafluorofosfato de tripirrolidinofosfonio
SASRIN:	Resina sensible superácida
TFA:	Ácido trifluoroacético
TIS:	Triisopropilsilano

35 **Ejemplo 1. Procedimiento general para la síntesis de patrones del péptido [¹⁹F]fluoroetiltriazol**

(a) A un vial Wheaton cargado con polvo de cobre (20 mg, malla -40) se añadió un análogo de [Tyr³]octreotato unido a alquino (péptido-alquino) (5 mg) en una solución de DMF/H₂O (1:1 v/v (60 µl)). A esto se añadió [¹⁹F] fluoroetilazida (1,5 eq, 0,354 M en DMF) (Glaser, M.; y Arstad, E., Bioconjugate Chemistry 2007, 18, (3), 989-993). La reacción se dejó agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se inactivó con 0,1 ml de MeCN al 20 %/ H₂O al TFA al 0,1 % antes de la inyección para purificación usando HPLC preparativa Agilent. Todos los análogos se aislaron usando un gradiente de 20-80 % MeCN/H₂O TFA al 0,1 % durante 30 minutos. El resultado de la espectrometría de

masas se resume en la Tabla 1 a continuación.

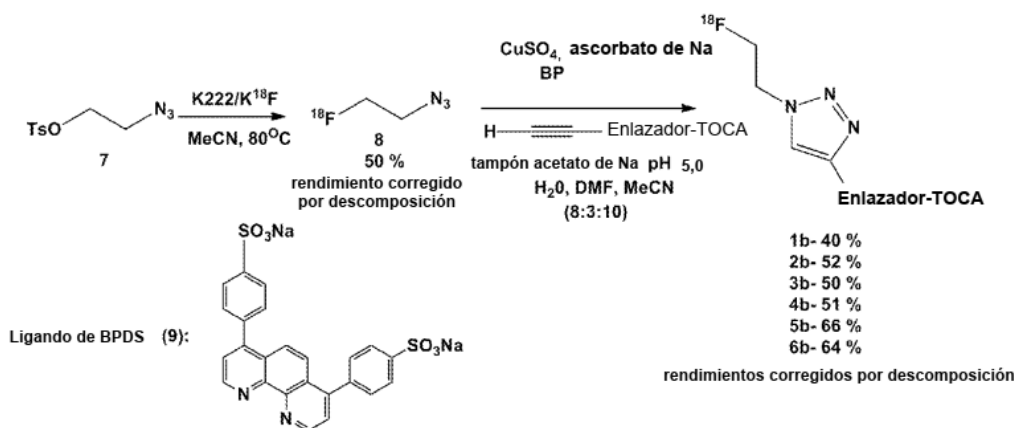
Tabla 1: Espectrometría de masas de los patrones de ^{19}F

Triazol	Rendimiento aislado	Datos de MALDI-TOF
^{19}F 1b	35 %	hallado $[\text{M}+\text{Na}]$ m/z 1604,7 $\text{C}_{71}\text{H}_{99}\text{FN}_{15}\text{O}_{21}\text{S}_2\text{Na}$ requiere m/z 1604,8
^{19}F 2b	44 %	hallado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1575,8 $\text{C}_{71}\text{H}_{100}\text{FN}_{14}\text{O}_{20}\text{S}_2\text{Na}$ requiere m/z 1575,8
^{19}F 3b	37 %	hallado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1269,0 $\text{C}_{56}\text{H}_{70}\text{FN}_{14}\text{O}_{14}\text{S}_2\text{Na}$ requiere m/z 1269,4
^{19}F 4b	56 %	hallado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1240,5 $\text{C}_{56}\text{H}_{71}\text{FN}_{13}\text{O}_{13}\text{S}_2\text{Na}$ requiere m/z 1240,4
^{19}F 5b	29 %	hallado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1340,4 $\text{C}_{59}\text{H}_{75}\text{FN}_{15}\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}$ requiere m/z 1340,5
^{19}F 6b	38 %	hallado $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 1340,5 $\text{C}_{59}\text{H}_{75}\text{FN}_{15}\text{O}_{15}\text{S}_2\text{Na}$ requiere m/z 1340,5

(b) **solo DMF.** Los patrones ^{19}F , ^{19}F 1b-6b, también se sintetizaron utilizando polvo de cobre y DMF como disolvente. Para los compuestos ^{19}F 1a y ^{19}F 3a, el uso de DMF como único disolvente se realizó lentamente (> 3 horas). La adición de agua (DMF:H₂O (3:2)) mejoró la velocidad de reacción con la finalización de la reacción en 15 minutos.

Ejemplo 2a. Procedimiento general para la síntesis de análogo de [Tyr³]Octreotato de 2- ^{18}F fluoroetiltriazol

Como se ilustra en el Esquema 1 a continuación, se puede preparar un análogo de [Tyr³]octreotato radiomarcado de la invención marcando un análogo de Tyr³octreotato unido a alquino por medio de una reacción de cicloadición de azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC) para formar un triazol 1,4-sustituido usando el reactivo 2- ^{18}F fluoroetilazida, es decir, un [Tyr³]octreotato unido a 2- ^{18}F fluoroetiltriazol de la invención. Se observó una variabilidad inesperada en la reactividad durante la reacción de CuAAC para cada análogo de alquino investigado.



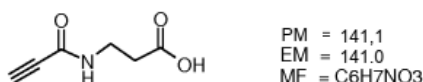
Esquema 1: la ruta de reacción a los triazoles marcados con ^{18}F : **1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **5a** y **6a**, cada uno como se describe en el presente documento.

Ejemplo 2b. Preparación de alquino

Se sintetizaron cinco análogos de octreotato funcionalizados con alquino (Figura 1) de manera análoga a la síntesis de $\beta\text{AB-TOCA}$ (**5a**) que se describe a continuación. Se diseñó un péptido mezclado (**6b**) (Figura 1) como control negativo para no mostrar especificidad para el receptor de somatostatina. Los enlaces entre la funcionalidad octreotato y el alquino se eligieron para complementar el péptido y facilitar la síntesis. Se diseñaron dos análogos que contienen grupos de polietilenglicol (**1a**) y (**2a**). Los octreotato alquinos (**1a-5a**) y el análogo mezclado (**6a**) se marcaron usando ^{18}F fluoroetilazida (**8**) (Esquema 1).

Ejemplo 2b.1 Síntesis de $\beta\text{AB-TOCA}$ (**5a**)

2b.1.1 Síntesis de propinoil- β -Ala-OH



Se añadió ácido propiónico (3,00 mmol, 184 μl) a una solución de sal H- β -Ala-OMe HCl (3,00 mmol, 419 mg), PyBOP (3,00 mmol, 1,56 g) y DIPEA (9,00 mmol, 1,53 ml) disueltos en NMP (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos, luego se diluyó con agua/TFA al 0,1 % y se cargó en una columna de HPLC preparativa para la purificación proporcionando propinoil- β -Ala-OMe.

El propinoil- β -Ala-OMe se disolvió en ACN/agua/TFA al 0,1 % (200 ml) y la solución se ajustó a pH 11 usando NaOH 0,1 M. La solución se agitó durante 1 hora y luego se redujo al vacío. El residuo (50 ml) se inyectó en una columna de HPLC preparativa para la purificación del producto.

Purificación y caracterización

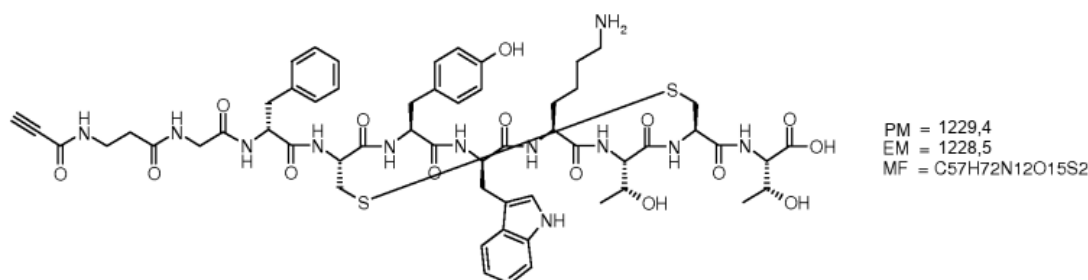
- 5 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 0 % de ACN/TFA al 0,1 % durante 60 min) proporcionó 260 mg (61 % basado en 3 mmol de material de partida) de propinoil- β -Ala-OH puro.

El material purificado se analizó por LC-MS analítico (gradiente: 0-15 % ACN/TFA al 0,1 % durante 5 min, t_R : 0,29 min, m/z hallado: 142,3 MH+ esperado: 142,0).

2b.1.2 Ensamblaje de H-Gly-[Tyr³]-Octreotato sobre soporte sólido

- 10 La resina de peptidilo H-Gly-D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-polímero se ensambló utilizando procedimientos estándar de síntesis de péptidos. La resina de peptidilo H-Gly-D-Phe-Cys(Trt)-Tyr(tBu)-D-Trp(Boc)-Lys(Boc)-Thr(tBu)-Cys(Trt)-Thr(tBu)-polímero se ensambló en el sintetizador de péptidos de microondas CEM Liberty comercialmente disponible usando química Fmoc comenzando con 0,25 mmol de resina Fmoc-Thr (tBu) -SASRIN. Se aplicó 1,0 mmol de aminoácido en cada etapa de acoplamiento (5 minutos a 80 °C)
- 15 usando 0,9 mmol de HBTU/0,9 mmol de HOBt/2,0 mmol de DIPEA para la activación *in situ*. Se eliminó el Fmoc por tratamiento de la resina con una solución de piperidina al 20 % en NMP.

2b.1.3 Síntesis de propinoil- β -Ala-Gly-[Tyr³]-Octreotato (es decir, β AB-TOCA (5a))



- 20 El propinoil- β -Ala-OH (0,50 mmol, 71 mg, descrito anteriormente en 2b. 1,1) y PyBOP (0,500 mmol, 260 mg) se disolvieron en NMP (5 ml) y se agregaron a la resina Octreotato (0,25 mmol, descrita anteriormente en 2b. 1,2). Se añadió DIPEA (2,00 mmol, 340 μ l) y la mezcla se agitó durante 90 minutos. Los reactivos se eliminaron por filtración y la resina se lavó con NMP, DCM y éter dietílico y se secó.

- 25 La eliminación simultánea de los grupos protectores de la cadena lateral y la escisión del péptido de la resina se llevó a cabo en TFA (100 ml) que contenía 2,5 % de TIS y 2,5 % de agua durante 90 minutos. La resina se eliminó por filtración, se lavó con TFA y los filtrados combinados se evaporaron al vacío. Se añadió éter dietílico al residuo, el precipitado formado se lavó con éter dietílico y se secó. El precipitado seco se disolvió en 50 % de ACN/agua y se dejó toda la noche para eliminar los grupos protectores de Trp restantes. La solución se liofilizó luego, proporcionando 294 mg (96 %) de propinoil-3-Ala-Gly-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Thr-Cys-Thr-OH en bruto.

- 30 Se añadió 2,2'-ditiodipiridina (0,27 mmol, 59 mg) disuelto en ACN (0,75 ml) en tres porciones iguales a propinoil-3-Ala-Gly-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys- crudo Thr-Cys-Thr-OH (294 mg) disuelto en ACN/agua/TFA al 0,1 % (300 ml) y la solución se agitó durante 30 min. La mezcla de reacción se cargó en una columna de HPLC preparativa para la purificación del producto.

Purificación y caracterización

- 35 La purificación por HPLC preparativa (gradiente: 20-40 % ACN/TFA al 0,1 % durante 60 min) proporcionó 140 mg (48 %) de propinoil- β -Ala-Gly- [Tyr³]-Octreotato puro.

El material purificado se analizó por LC-MS analítico (gradiente: 20-30 % ACN/TFA al 0,1 % durante 5 min, t_R : 2,49 min, m/z hallado: 1229,5, MH+ esperado: 1229,5).

Radioquímica

Ejemplo 3. Preparación de 2-[¹⁸F]Fluoroetilazida (8)

- 40 El procedimiento utilizado para sintetizar 8 se modificó ligeramente al empleado por Glaser y col. (Glaser, M., y col., Bioconjugate Chemistry 2007, 18, (3), 989-993; Demko, Z. P., y col., Angewandte Chemie-Edición internacional 2002, 41, (12), 2113-2116). El uso de KHCO₃ en lugar de K₂CO₃ durante la etapa de secado de [¹⁸F]fluoruro dio rendimientos aislados más consistentes después de la purificación por destilación, debido a la estabilidad mejorada del precursor,

7 utilizando la base más suave.

A una mezcla de Kryptofix 222 (5 mg, 13,3 μmol), hidrogenocarbonato de potasio (1,4 mg, 16,7 μmol , en 100 μl de agua) y acetonitrilo (0,5 ml) se añadió [^{18}F]fluoruro (5-15 mCi) en agua (0,1-1 ml). El disolvente se eliminó calentando a 100 $^{\circ}\text{C}$ bajo una corriente de nitrógeno (100 ml/min). Después de ello, se añadió acetonitrilo (0,5 ml) y se continuó la destilación. Este procedimiento se repitió dos veces más. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió una solución de 2-azidoetil-4-toluenosulfonato (**7**) (1,3 μl , 6,5 μmol) (Glaser, M.; y col., Bioconjugate Chemistry 2007, 18, (3), 989-993; Demko, Z. P.; y col., Angewandte Chemie-Edición internacional 2002, 41, (12), 2113-2116) en acetonitrilo anhidro (0,2 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos a 80 $^{\circ}\text{C}$. El [^{18}F] **8** se destiló a 130 $^{\circ}\text{C}$ en un vial de retención que contenía acetonitrilo (30 μl) (Arstad, E., documento WO2008/015391A1). El compuesto [^{18}F] **8** se recolectó con rendimientos radioquímicos entre 50-55 % (corrección de desintegración).

La generación de 2- ^{18}F fluoroetilazida para la preparación de muestras mediante química de clic, posteriormente utilizado para estudios *in vivo*, se llevó a cabo en un aparato controlado a distancia construido en Hammersmith Imanet. El sistema permite el uso de ~ 200-300 mCi de [^{18}F]fluoruro como actividad inicial. Los rendimientos radioquímicos (corrección de desintegración) de la [^{18}F] fluoroetilazida aislada usando este sistema varían del 19 al 26 %. Sin embargo, la generación de 2- ^{18}F fluoroetilazida se puede lograr por otros medios conocidos en la técnica (Glaser, M.; y col., Bioconjugate Chemistry 2007, 18, (3), 989-993; Demko, Z. P.; y col., Angewandte Chemie-Edición internacional 2002, 41, (12), 2113-2116); documento WO2008/015391A1).

Ejemplo 4. Procedimiento general de marcado

Para los alquinos **1a**, **2a** y **4a**: A una solución de sulfato de cobre (II) pentahidrato (4 eq.) en agua (25 μl) se añadió L-ascorbato de sodio (4,4 eq.) en 25 μl de solución tampón de acetato de sodio (pH 5,0, 250 mM) en N_2 seguido de BPDS (**9**) (5 eq.) en 25 μl de agua. Para los alquinos **3a** y **5a**, se usaron CuSO_4 (2 eq), ascorbato de Na (2,2 eq) y BPDS (**9**) (4 eq).

Se añadió una solución de [^{18}F] **8** en MeCN (100 μl) seguido por el alquino (2 mg) en DMF (30 μl) y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente (véase la Tabla 2 para el tiempo de reacción óptimo). La reacción se diluyó luego con H_2O TFA al 0,1 % (100 μl) y se purificó por HPLC preparativa de fase inversa usando el gradiente indicado en la Tabla 2. La fracción de HPLC se diluyó luego con H_2O (15-19 ml) y se cargó en un cartucho tC 18 light SPE. El producto se eluyó con etanol en fracciones de 100 μl y se completó hasta una solución de tampón de etanol/PBS al 10 % (pH 7,0) con > 98 % de RCP.

Tabla 2: Disolventes de HPLC MeCN/ H_2O TFA al 0,1 % ("B"), 3 ml/min usando un Luna C18 5u, 100 x 10 mm, 5 micrómetros, 110 A

Alquino	Tiempo de reacción	Gradiente de HPLC	Actividad seudoespecífica (GBq/ μmol)	Rendimiento aislado (%) (corregido por desintegración)
1a	30 min	25-50 % de B durante 30 minutos	4,8	40
2a	15 min	15-40 % de B durante 25 min	5,9	52
3a	5 min	25-50 % de B durante 20 min	5,9	50
4a	30 min	25-50 % de B durante 25 min	8,4	51
5a	5 min	25-50 % de B durante 25 min	11,2	66
6a	15 min	25-50 % de B durante 25 min	12,3	64

Ejemplo 5. Mediciones del coeficiente de partición de octanol/tampón fosfato (Log D)

Los coeficientes de partición de octanol/PBS se determinaron usando el procedimiento de matraz de agitación. Ambos disolventes se presaturaron uno y otro agitando ambos durante 5 minutos. A una solución de 500 μl de octanol y PBS se añadieron 20 μl de ligando radiomarcado en EtOH (n= 3). Las mezclas de soluciones se agitaron en un mezclador rotatorio durante 5 minutos. Después del equilibrado, se centrifugaron las mezclas (10 min a 13.000 rpm) para lograr una buena separación. Se tomaron las muestras de cada capa (25 μl) y se midieron en un contador y se calculó el log D de acuerdo con la fórmula:

$$\log D = \log (\text{cpm en capa de octanol}/\text{cpm en capa acuosa}).$$

Los valores de log D se midieron usando el triazol marcado con ^{18}F . Como se esperaba, los valores de Log D para los análogos **1b** y **2b** fueron los más bajos debido a la PEGilación, y el análogo con el valor de Log D más alto fue **4b** (Tabla 3). Las afinidades del receptor para [^{19}F] **1b-6b** se determinaron usando un ensayo de unión competitiva en

células tumorales AR42J con [¹¹¹In]-OctreoScan como radiotrazador marcado. Se calcularon los valores de concentración inhibitoria semimáxima (Cl₅₀) y se resumen los resultados de las curvas de desplazamiento (Tabla 3). Como péptido de referencia, Se midió el valor de Cl₅₀ para Octreotida y se encontró que era de 14,7 ± 7,7 nM. Los valores de Cl₅₀ para los análogos de octreotato fueron comparables o inferiores a los de octreotida, lo que indica alta afinidad de unión por el receptor de somatostatina; todos mostraron alta afinidad de unión al receptor en el rango nanomolar. La introducción del resto fluoroetiltriazol disminuyó la afinidad por [¹⁹F]-**2b,3b,4b** y **5b** pero no significativamente, los valores todavía estaban por debajo o eran comparables a los de octreotida. En este estudio, el compuesto [¹⁹F]-**5b** mostró la mayor afinidad con un valor de Cl₅₀ de 1,6 ± 0,2 nM. La PEGilación de los péptidos, mediante la adición de seis grupos secuenciales de etilenglicol, pareció no afectar significativamente a la afinidad general de [¹⁹F]-**1b** Y [¹⁹F]-**2b**, dando valores de Cl₅₀ de 2,9 ± 1,3 nM y 13,2 ± 7,8 nM, respectivamente. En comparación [¹⁹F]-**6b**, que contenía una secuencia de aminoácidos mezclada, mostró baja afinidad, dando un valor de Cl₅₀ > 10 mM. Este resultado mostró que nuestros análogos se unen específicamente al receptor de somatostatina.

Tabla 3: Valores de Cl₅₀ de ensayo de unión competitiva usando **1a-5a** Y [¹⁹F]-**1b-6b** desplazando [¹¹¹In]-DTPA-Octreotida en células tumorales AR42J y valores de Log D de [¹⁸F]-**1b-6b**.

Péptidos	Análogo de alquino (a) Cl ₅₀ (nM)	Análogo de triazol (b) Cl ₅₀ (nM)	Control	Log D de ¹⁸ F-triazol
1	5,3 ± 0,75	10,8 ± 5,9		-2,68
2	5,1 ± 2,1	13,2 ± 7,8		-2,77
3	1,4 ± 0,1	4,0 ± 1,4		-1,83
4	1,8 ± 0,8	2,9 ± 1,3		-1,5
5	1,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2		-2,26
6		>10,0 (mM)		-1,14
Octreotida			14,7 ± 7,7	

*N.B. (n = 4 para cada concentración y ensayo repetido tres veces). Mediciones del Log D del coeficiente de partición **1b-5b** (n = 3), **6b** (n = 6). Valores de Cl₅₀ de AIF-NOTA-Octreotida, Ga-NOTA-Octreotida hallados por Laverman, P., y col. (Journal of Nuclear Medicine 51, (3), 454-461) fueron 3,6 ± 0,6, 13,0 ± 3,0 nM respectivamente.*

15 Ejemplo 6. Determinación de la unión al receptor *in vitro*.

Para determinar la afinidad de unión de análogos de [Tyr]³-octreotato unido a [¹⁹F]-fluoroetiltriazol [¹⁹F]-**1b-6b**, y los análogos de alquino-octreotato (**1a-6a**) se realizó un ensayo *in vitro* utilizando una modificación del procedimiento previamente indicado por Hofland y col. (Hofland, L. J.; y col., Endocrinology 1995, 136, (9), 3698-706). Se sembraron células AR42J (5 X 10⁴) en placas de 24 pocillos, se lavaron dos veces en PBS y se incubaron con concentraciones crecientes (0, 0,01, 0,1, 1, 1,0, 10, 100, 1000 y 10000 nM) del compuesto que se analiza 10 min a temperatura ambiente, permitiendo tiempo suficiente para que se produzca la unión bajo estas condiciones experimentales (Scemama, J. L.; y col., Gut 1987, 28 Suppl, 233-6). A continuación, las placas se incubaron luego durante 30 minutos más con [¹¹¹In] OctreoScan (Covidien, Gosport, Reino Unido: (50.000 cpm por pocillo). Se utilizó un volumen final de 0,25 ml de tampón de incubación por pocillo. El tampón de incubación consistió en HEPES 10 mM, 5,0 mM, MgCl₂ 6H₂O, bacitracina 1,0 mM, 1 % de BSA, y el pH final se ajustó a 7,4. Al final de la incubación, las placas se lavaron tres veces en tampón de incubación helado y se solubilizaron en solución de NaOH 0,2N. Los contenidos de cada pocillo se transfirieron luego a tubos de recuento y se contaron muestras usando un contador gamma (Biosoft, Ferguson, MO). Cada concentración se realizó por cuadruplicado y el experimento se repitió tres veces. Los resultados se expresan como un porcentaje de control (los primeros cuatro pocillos tratados solo con [¹¹¹In]OctreoScan marcado). Los valores de Cl₅₀ se calcularon a partir de la curva de desplazamiento sigmoideal ajustada utilizando el software GraphPad Prism (versión 4.00) para Windows, Software GraphPad, Inc).

Ejemplo 7. Uso de alambre de cobre como catalizador

Se investigó el uso de alambre de cobre como fuente alternativa de Cu catalítico (I). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando **3a** debido a su reactividad mejorada en comparación con otros análogos que utilizan el procedimiento CuSO₄/Na-ascorbato. Se descubrió que premezclar el alambre de cobre y el alquino y luego calentar antes de la adición de **8** mostraban que la reacción se completaba en 5 minutos (Tabla 4, entrada 2). Sin premezclar los dos componentes, la reacción de clic tardó más en completarse (Tabla 4, entrada 1). Otros sistemas de tampón de pH (Tabla 4, las entradas 4,5 y 6) también se aplicaron, pero todos resultaron inferiores a la solución tampón de acetato de sodio (pH 5,0, 250 mM) (Tabla 4, entrada 1). Se añadieron CuSO₄ y BPDS (**9**) a la reacción usando alambre de cobre. La razón detrás de este enfoque es que el CuSO₄ añadido mejoraría la reacción de proporcionalización al aumentar la concentración de Cu (II) disponible (Gopin, A., y col., Bioconjugate Chemistry 2006, 17, 1432-1440; Bonnet, D., y col., Bioconjugate Chemistry 2006, 17, 1618-1623). El ligando (**9**) como se ha mencionado anteriormente, se añadió para estabilizar la especie Cu (I). La estrategia funcionó bien y mostró una mejora en los rendimientos a temperatura ambiente (Tabla 4, entrada 7). Para establecer si esto era un efecto tándem, se llevaron a cabo reacciones para investigar ambos reactivos adicionales por separado (Tabla 4, entradas 7,8). Parece que ambos reactivos afectan a la velocidad en cierta medida, pero usados juntos tienen un mayor impacto en la velocidad de la reacción. MonoPhos™ (Campbell-Verduyn, L. S., y col., Chemical Communications 2009, (16), 2139-2141) se investigó como

un ligando alternativo, pero demostró ser menos eficiente en la reacción (Tabla 4, entrada 10).

Tabla 4: Experimentos catalizados con alambre de cobre utilizando alquino **3a** (rendimiento radioquímico analítico por HPLC)

	Temperatura de reacción	pH	Disolventes (v/v)	Tiempo de preactivación (min)	Otros aditivos	Rendimiento analítico (%) en:		
						5 min	15 min	30 min
1	80 °C	5,0	DMF/AB (1:3)	0	-	52	95	
2	80 °C	5,0	DMF/AB (1:3)	30	-	>98		
3	ta	5,0	DMF/AB (1:3)	150	-	0	7	30
4	80 °C	6,0	DMF/PB (1:3)	0	-	4		
5	80 °C	4,0	DMF/FB (1:3)	0	-	3		
6	80 °C	8,0	DMF/TB (1:3)	0	-	2		
7	ta	5,0	DMF/AB (1:3)	0	40 mol % CuSO ₄ , BPDS (9) (2 eq)	67	>98	
8	ta	5,0	DMF/AB (1:3)	0	40 mol % CuSO ₄ ,	0	0	48
9	ta	5,0	DMF/AB (1:3)	0	BPDS (9) (2 eq)	35	54	>98
10	ta	5,0	DMSO/AB (7:3)	0	Ligando MonoPhos (2 eq)	0	0	0

Todos los tampones son concentraciones de 250 mM. Tampón de acetato de sodio (AB) pH 5,0; Tampón de fosfato de sodio (PB) pH 6,0; Tampón de formiato de amonio (FB) pH 4,0; Tampón Tris (TB) pH 8,0. Cada experimento contenía 100-120 mg de una bobina de alambre de cobre (ta = temperatura ambiente).

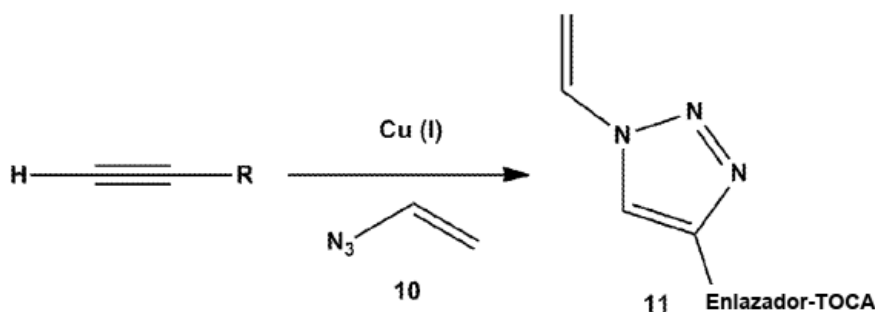
Resultados

- 5 Se ha identificado que los análogos e [Tyr³]octreotato unido a alquino, G-TOCA (**3a**) y βAG-TOCA (**5a**) son altamente reactivos en la reacción de clic que muestra la conversión completa a los análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol FET-G-TOCA (**3b**) y FET-βAG-TOCA (**5b**) en condiciones suaves y con tiempos de síntesis cortos (5 minutos a 20 °C). Además de la facilidad de síntesis, la unión *in vitro* a las células AR42J de tumor pancreático mostró que tanto FET-G-TOCA (**3b**) y FET-βAG-TOCA (**5b**) tienen una alta afinidad por el receptor de somatostatina con CI₅₀ de 4,0 ± 1,4 y 1,6 ± 0,2 nM respectivamente.

La variabilidad en las velocidades de reacción de clic observadas para los péptidos alquino **1a-5a**, puede atribuirse a la variación en el enlazador, ya que el resto peptídico permanece sin cambios. Se cree que la propiedad electrónica del grupo adyacente al centro de alquino terminal no mejora ni reduce la velocidad de reacción (Hein, J. E., y col., Chemical Society Reviews 2010, (39), 1302-1315). Contrariamente a esto, ahora se ha descubierto que los alquinos terminales sustituyen directamente con un resto amida (**1a, 3a, 5a, 6a (Figura 1)**) tenía una reactividad mejorada en comparación con aquellos directamente sustituidos con una amida unida a etilo (**2a y 4a, (Figura 1)**). Li y col. (Tetrahedron Letters 2004, 45, 3143-3146) hallaron resultados similares durante sus investigaciones sobre la reacción de cicloadición 1,3-Huisgen y por separado por Golas y col., (Macromolecular Rapid Communications 2008, 29, 1167-1171) quienes investigaron el efecto de los grupos de extracción de electrones y el impedimento estérico alrededor del resto azida sobre la tasa de CuAAC. Otro factor a tener en cuenta junto con la naturaleza electrónica del alquino es el tamaño del péptido alquino. Cinéticamente se esperaría que cuanto mayor sea el péptido alquino, más lenta será la velocidad de reacción, que resultó ser el caso con los análogos PEGilados (**1a, 2a**). Se puede ver que **1a** reacciona más lentamente que **3a y 5a** (Tabla 5, condiciones B). Electrónicamente son similares, todos están directamente unidos a alquinos terminales sustituidos con amida, pero **1a** contiene seis grupos secuenciales de etilenglicol. Es posible que la cadena de PEG esté rodeada por una nube de agua voluminosa que podría obstaculizar estéricamente la funcionalidad alquino (Shiffman, M. L., Current Hepatitis Reports 2003,2, 17-23). Los alquinos **2a y 4a** son comparables en el mismo aspecto (PEGilado frente a no PEGilado); se observó que **2a** muestra una velocidad de reacción más lenta durante el CuAAC. Debido a la menor velocidad de reacción y variación encontrada usando **1a y 2a** durante la reacción de clic, fue necesario aumentar la concentración de reactivos. Se observaron mejoras en la reproducibilidad y la velocidad de reacción (Condiciones D, Tabla 5). Los análogos **1b-6b** se aislaron para dar rendimientos corregidos sin degradación del 3-7 % (basado en la actividad de flúor inicial) después de 90-120 minutos. La velocidad de reacción se incrementó usando temperaturas más altas con tiempos de reacción reducidos, pero esto condujo a una importante formación de subproductos y dificultó la purificación (Tabla 5, condiciones C).

Una tendencia general encontrada durante la reacción de clic con los análogos **1a-6a** fueron dos subproductos estables vistos durante la monitorización por HPLC. Los dos subproductos **11 y 12** (Esquema 2, Figura 1a) se aislaron de los medios de reacción usando **5a** (Figura 1). Se separaron, recogieron y analizaron por espectrometría de masas por disociación inducida por colisión (CID-MS). Se dilucidó que el compuesto más polar **12** era el precursor de alquino (**5a**) durante el análisis CID-MS. Aunque este fue el caso, cuando la mezcla de reacción se mezcló con **5a** y se evaluó cromatográficamente, el producto **12** no coeluyó en la traza de HPLC. Se descubrió que las reacciones que mostraban

una incorporación incompleta de 2-[¹⁸F]fluoroetilazida (**8**) no continuaron significativamente, incluso en presencia de **12**, lo que sugiere reactividad insuficiente de esta especie en la reacción CuAAC. Se analizó el subproducto **11** y se descubrió que correspondía al 1-vinil triazol (Esquema 2).



Esquema 2: ruta supuesta para formar el subproducto **11**

5 Presumiblemente se formó **11** a través de la reacción de clic con azidoeteno (**10**), que se sospecha que es un subproducto de un mecanismo de eliminación en la etapa inicial de marcado. Kim y col. (Applied Radiation and Isotopes 2010, 68, 329-333) informaron de un evento similar usando 4-tosiloxi-1-butino; observaron la eliminación para formar vinil acetileno, que luego pudo reaccionar con la azida en la reacción de clic. El problema principal con el subproducto **11** es el tiempo de retención similar al producto radiomarcado durante la purificación, lo que dificulta obtener el mayor rendimiento posible, así como una alta radiactividad específica.

Los experimentos llevados a cabo usando el procedimiento de CuSO₄/Na-ascorbato se realizaron generalmente usando tampón de acetato de sodio (AB) a pH 5,0. Cuando se realizó un experimento usando **3a** usando agua destilada, la conversión a producto radiomarcado fue más lenta, mostrando 78 % de conversión a los 5 min en comparación con > 98 % de conversión utilizando el sistema tamponado.

15 Se llevó a cabo una reacción en un recipiente en la que se evitó la destilación de **8**. La reacción se intentó con **2a** y **3a**, pero ambos mostraron velocidades de reacción más lentas presumiblemente debido a reacciones secundarias competidoras. Otra variable que puede afectar a la velocidad de reacción es el volumen de 2-[¹⁸F]fluoroetilazida. Una reacción llevada a cabo usando las condiciones B (Tabla 5) con **2a** y 50 µl de 2-[¹⁸F]fluoroetilazida (**8**) dio 84 % de conversión a **3b** después de 30 minutos. Cuando se usaron 100 µl de **8** en las mismas condiciones, no se observó reacción (Tabla 5).

Se descubrió que usando el ligando BPDS (**9**) (Esquema 1), un ligando estabilizador de Cu (I) (Gill, H. S., y col., Journal of Medicinal Chemistry 2009, 52, 5816-5825), mejora en gran medida la velocidad de la reacción de clic. La reacción se evaluó sin ningún ligando. Las reacciones llevadas a cabo con **4a** sin **9** (Tabla 5, condiciones A) mostraron una conversión del 14 % al producto deseado pero con la adición de **9** (condiciones B), dio 47 % de conversión. El uso de las mismas concentraciones de reactivo pero calentando la reacción a 80 °C dio > 98 % de conversión a **4b** después de 5 minutos (Tabla 5, condiciones C); aunque la conversión a producto a esta temperatura fue excelente, se observó un aumento de los subproductos, algunos de los cuales eluyeron con **4b**.

Tabla 5: Rendimiento analítico radioquímico observado mediante análisis HPLC

Alquino	Rendimientos analíticos (tiempo de reacción, min)			
	Condiciones A ^a	Condiciones B ^b	Condiciones C ^c	Condiciones D ^d
1a		19 % (30)	> 98 % (30)	>98 % (30)
2a		0 % (30)	0 % ^(e) (30)	> 98 % (30)
3a		> 98 % (5)	> 98 % (5)	
4a	14 % (30)	47 % (30)	97 % (5)	> 98 % (30)
5a		> 98 % (5)		
6a		77 % (30)		> 98 % (15)

^aCondiciones A: Alquino (2 mg), CuSO₄ (2 eq.), Ascorbato de Na (2,2 eq), pH 5,0, ta
^bCondiciones B: Alquino (2 mg), se usaron CuSO₄ (2 eq), Ascorbato de Na (2,2 eq), **9** (4 eq), pH 5,0, ta
^cCondiciones C: Alquino (2 mg), se usaron CuSO₄ (2 eq), Ascorbato de Na (2,2 eq), **9** (4 eq), pH 5,0, 80 °C
^dCondiciones D: Alquino (2 mg), CuSO₄ (4 eq), Ascorbato de Na (4,4 eq), **9** (5 eq), pH 5,0, ta
^(e) No queda alquino en la reacción, solo los subproductos se encuentran en la traza de UV.

En conclusión, cinco análogos de octreotato funcionalizados con alquino nuevos se hicieron reaccionar en la reacción de clic con 2-[¹⁸F]fluoroetilazida. Los alquinos más reactivos fueron G-TOCA (**3a**) y βAG-TOCA (**5a**), mostrando una conversión completa al triazol marcado FET-G-TOCA (**3b**) y FET-βAG-TOCA (**5b**) en cinco minutos a temperatura

ambiente usando condiciones optimizadas. Además de la eficiencia en la reacción de clic, ambos análogos han mostrado altas afinidades de unión al receptor de somatostatina.

Ejemplo 8. Ensayo de unión *in vitro*. La afinidad de un análogo de [¹⁹F]fluoroetiltriazol-[Tyr³]octreotato de la presente invención para el receptor de somatostatina subtipo sstr-2, frente a sstr-3 y sstr-4 como subtipos de receptores de baja afinidad de control, se determinó usando un ensayo de lector de placa de imágenes fluorométricas (FLIPR). El ensayo implicó medir la activación inducida por [¹⁹F]fluoroetiltriazol-[Tyr³]octreotato de un flujo de calcio en células Chem-1 que expresan sstr-2, 3 o 4 (Millipore, St Charles, MO, EE.UU.) que se precargaron con un colorante de calcio. En resumen, las células Chem-1 que expresan el subtipo sstr específico se sembraron en placas de 96 pocillos a 50.000 células/pocillo y se incubaron en una incubadora con CO₂ al 5 % durante 24 h. Las células se lavaron y se cargaron con colorante Fluo-8-No-Wash Ca²⁺ en el tampón de ensayo GPCRProfiler™ (Millipore) durante 90 minutos a 30 °C en una incubadora con CO₂ al 5 %. Se añadieron diferentes concentraciones de [¹⁸F]fluoroetiltriazol-[Tyr³]octreotato de la presente o somatostatina (Sigma; control positivo), seguido de determinación de la fluorescencia. El ensayo se realizó en modo agonista por duplicado. La actividad antagonista no se evaluó debido a la actividad agonista. La salida de fluorescencia se midió y los datos se expresaron como % de señal de fluorescencia máxima después de la corrección basal. La activación del receptor medio máximo para los diversos ligandos se estimó mediante un ajuste de respuesta a la dosis sigmoidea utilizando GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU).

Ejemplo 9. Modelos animales y tumorales. Se obtuvieron ratones atímicos hembra BALB/c nu/nu de seis a ocho semanas de edad de Harlan United Kingdom Ltd (Bicester, Reino Unido). Se cultivaron la línea celular de tumor pancreático sstr-2 alta AR42J (Taylor J.E., y col., 1994; 15: 1229-1236) y la línea celular de cáncer de colon humano sstr-2 baja HCT116 (Normas LGC, Middlesex, Reino Unido), respectivamente, en medio de crecimiento F12K y RPMI1640 que contenía 10 % (v/v) de suero bovino fetal, 2 mmol/l de L-glutamina, 100 unidades/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomocina y se cultivaron en una incubadora con CO₂ al 5 % a 37 °C. Los tumores se establecieron por inyección subcutánea de 100 µl de PBS que contenía 1 x 10⁶ células. Todos los experimentos con animales fueron realizados por investigadores autorizados de acuerdo con la Home Office Guidance on the Operation of the Animal (Scientific Procedures) Act 1986 del Reino Unido y dentro de las pautas establecidas por el Comité del Instituto Nacional de Investigación del Cáncer del Reino Unido sobre Bienestar de los Animales en la Investigación del Cáncer (Workman, P., y col., Br J Cancer. 2010;102:1555-1577). Las dimensiones del tumor se midieron continuamente usando un calibrador y los volúmenes del tumor se calcularon mediante la ecuación: volumen = (π/6) x a x b x c, en la que a, b y c representan tres ejes ortogonales del tumor. Los ratones se usaron cuando los tumores alcanzaron ~200 mm³.

Ejemplo 10. Estabilidad plasmática *in vivo* de FET-βAG-TOCA. Se inyectó FET-βAG-TOCA (~ 3,7 MBq) a través de la vena de la cola en ratones BALB/c nu/nu no portadores de tumor. Se obtuvo sangre bajo anestesia general con isoflurano a los 30 minutos después de la inyección y se prepararon muestras de plasma e inmediatamente se congelaron en hielo. Para analizar, las muestras se descongelaron y se mantuvieron a 4 °C inmediatamente antes de su uso. El plasma (-0,2 ml) se aclaró mediante la adición de metanol helado (1,5 ml), seguido de la centrifugación de la mezcla (3 minutos, 20.000 x g; 4 °C). El sobrenadante se evaporó a sequedad usando un evaporador rotativo (Heidolph Instruments GMBH & Co, Schwabach, Alemania) a una temperatura de baño de 35 °C. El residuo se volvió a suspender en fase móvil HPLC (1,2 ml), se aclaró (filtro de 0,2 µm) y la muestra (1 ml) se inyectó a través de un bucle de muestra de 1 ml en la HPLC. Las muestras se analizaron por radio-HPLC en un sistema HPLC Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Stockport, Reino Unido) equipado con un detector gamma γ-RAM Modelo 3 (IN/US Systems inc., UU.) Y el software Laura 3 (Lablogic, Sheffield, Reino Unido) y UV (254 nm). Una fase estacionaria de columna Waonda µBondapak C₁₈ (300 mm x 7,8 mm) se eluyó con una fase móvil que comprendía 67 % de agua (TFA al 0,1 %)/33 % de acetonitrilo (TFA al 0,1 %) suministrada isocráticamente a 3 ml/min.

Ejemplo 11. Estudios de imagen PET. Las exploraciones dinámicas de imágenes PET se llevaron a cabo en un escáner PET dedicado para animales pequeños, (Módulo PET Inveon de Siemens, Siemens Molecular Imaging Inc, Reino Unido) (Workman, P., y col., Br J Cancer. 2010;102:1555-1577; Leyton, J., y col., Cancer Res. 2006;66:7621-7629). En resumen, las venas de la cola se canularon bajo anestesia general (isoflurano). Los animales se colocaron dentro de un ambiente controlado termostáticamente dentro del escáner; se monitorizó la frecuencia cardíaca durante todo el estudio. Se inyectó a los ratones 3,0-3,7 MBq de los diferentes compuestos radiomarcados y se obtuvieron exploraciones PET-CT dinámicas en formato de modo de lista durante 60 minutos. En el caso de FET-βAG-TOCA, también se realizaron estudios de bloqueo en los que la inyección de radiotrazadores y la formación de imágenes comenzaron 10 minutos después de la inyección i.v. de 10 mg/kg de octreotida no marcada (Sigma) a los ratones; esta dosis de octreotida fue ~ 100 veces mayor que la dosis equivalente de FET-βAG-TOCA no marcado en el inyectado radiotrazador. Los datos adquiridos en todos los casos se clasificaron en contenedores sinogram de 0,5 mm y 19 marcos temporales (vóxeles de 0,5 x 0,5 x 0,5 mm; 4 x 15 s, 4 x 60 S y 11 x 300) para la reconstrucción de imágenes. Los conjuntos de datos de imágenes obtenidos se visualizaron y cuantificaron utilizando el software Siemens Inveon Research Workplace. Las regiones tridimensionales de interés (ROI 3D) se definieron manualmente en cinco tumores adyacentes, regiones de hígado, riñón, musculares o de orina/vejiga (cada una de 0,5 mm de espesor). Los datos se promediaron para los tejidos en cada uno de los 19 puntos de tiempo para obtener curvas de tiempo frente a radioactividad (TAC). La absorción de radiotrazador para cada tejido se normalizó a la dosis inyectada y se expresó como porcentaje de actividad inyectada por ml de tejido (% DI/ml).

Ejemplo 12. Recuento directo de radiactividad tisular. Después de la exploración PET de 60 minutos, una parte del tejido tumoral se obtuvo de ratones después del desangrado mediante punción cardíaca bajo anestesia general con isoflurano. Todas las muestras se pesaron y su radioactividad se determinó directamente usando un contador Cobra II Auto-gamma (anteriormente Packard Instruments Meriden CT USA) aplicando una corrección de desintegración. Los resultados se expresaron como un porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% DI/g).

Ejemplo 13. Estadística. Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism, versión 4.00 (GraphPad, San Diego, CA). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. El valor de P de dos colas $\leq 0,05$ se consideró significativo.

Resultados

Radiotrazadores. Todos los radiotrazadores se prepararon con éxito con > 98 % de pureza radioquímica. El tiempo total de síntesis fue de $\sim 1,5$ h. La lipofilia (Log D) de los radiotrazadores se midió utilizando procedimientos conocidos en la técnica (Barthel, H., y col., Br J Cancer. 2004;90:2232-2242) y el Log D medido se muestra en la **Tabla 6**. Debido a que los animales fueron escaneados en diferentes días, también se presenta la radiactividad específica media para cada radiotrazador (**Tabla 6**). **Tabla 6.** Comparación de la absorción de tejido de análogos de [^{18}F]-octreotato en xenoinjertos tumorales AR42J que crecen en ratones desnudos. Los datos de imagen se presentan para el punto de tiempo de 60 minutos junto con los datos obtenidos al contar piezas de tejido directamente en un contador y poco después del estudio de imagen. Los estudios de bloqueo *in vivo* de FET- β AG-TOCA se realizaron después de inyección i.v. de octreótido no marcado (10 mg/kg) a ratones seguido 10 minutos después por inyección del radiotrazador. Los datos son medias \pm SE, n=3-6.

Análogo de octreotato	Log D	Radioactividad específica (GBq/ μmol)*	Tumor estudiado	Absorción de radiotrazadores tumorales a los 60 min por imagen (% DI/ml)	Absorción de radiotrazadores tumorales tras 60 min mediante recuento y (% DI/g)
FET-G-PEG-TOCA	-2,68	4,8	AR42J	5,36 \pm 0,45	8,29 \pm 1,42
FETE-PEG-TOCA	-2,77	5,9	AR42J	5,14 \pm 0,40	9,78 \pm 2,57
FET-G-TOCA	-1,82	5,9	AR42J	11,0 \pm 1,49	17,04 \pm 2,76
FETE-TOCA	-1,50	8,4	AR42J	6,11 \pm 1,46	4,50 \pm 1,51
FET- β AG-TOCA	-2,06	3,9	AR42J	8,23 \pm 2,02	11,58 \pm 0,67
FET- β AG-TOCA	-2,06	18,7	HCT116	2,42 \pm 0,35	0,52 \pm 0,39
Bloqueo de FET- β AG-TOCA	-2,06	11,2	AR42J	6,24 \pm 0,64	3,93 \pm 0,99
FET- β AG-[W-c-(CTFTYC)K]	-1,14	12,3	AR42J	0,10 \pm 0,05	0,22 \pm 0,12
[^{18}F]AIF-NOTA-OC	ND	36,1	AR42J	6,43 \pm 0,85	12,73 \pm 0,05
[^{68}Ga]DOTA-TATE	ND	ND	AR42J	2,75 \pm 0,11	3,78 \pm 0,32

*Determinado al final de la síntesis

ND: No determinado

Especificidad de subtipo sstr *in vitro*. Todos los análogos de [^{19}F]fluoroetilriazol-[Tyr 3]octreotato exhibieron actividad agonista en sstr-2 (**Figura 14**), con el péptido mezclado, (FET- β AG- [W-c- (CTFTYC) K]), teniendo una mala afinidad prevista. La afinidad de los ligandos (CE_{50}) osciló entre 4 y 19 nM (frente a somatostatina a 5,6 nM) mostrando los análogos de polietilenglicol (PEG)-TOCA la menor afinidad por sstr-2. La actividad antagonista no se evaluó porque los análogos poseían una actividad agonista significativa. Ninguno de los compuestos exhibió actividad detectable contra sstr-3. Todos los análogos de [^{19}F]fluoroetilriazol-[Tyr 3]octreotato excepto el péptido mezclado mostraron actividad detectable contra sstr-4 pero la afinidad fue muy pobre ($\geq 5,4$ mM). Los estudios *in vitro* revelaron que los análogos de triazol tenían una alta afinidad selectiva por sstr-2 con actividad agonista semimáxima en el ensayo de flujo de calcio para este receptor acoplado a proteína G (CE_{50}) que oscilaba entre 4 y 19 nM, en comparación con el péptido mezclado, que tenía una afinidad baja.

FET- β AG-TOCA es estable *in vivo*. Se examinó la estabilidad *in vivo* de FET- β AG-TOCA. Los radiocromatogramas típicos de la solución de dosis y el plasma de ratón de 30 minutos se muestran en la **Figura 15**. No se observaron metabolitos de FET- β AG-TOCA; solo se encontró el trazador original intacto. El efecto combinado de la alta afinidad de unión por el receptor sstr y el lavado rápido del tejido no objetivo produjo imágenes de PET de alto contraste *in vivo*, demostrado para FET- β AG-TOCA en la **Figura 16**. Las curvas crecientes de tiempo tumoral frente a actividad

de FET- β AG-TOCA derivadas de los datos de imagen de PET dinámico *in vivo* (**Figura 17**) reflejaron la alta unión selectiva de FET- β AG-TOCA. El radiotrazador era metabólicamente estable en ratones y tenía una baja absorción ósea que indicaba que no había defluoración significativa.

5 **Farmacocinética y localización tumoral *in vivo* de análogos de [¹⁸F]fluoroetiltriazol-[Tyr³]octreotato.** Dada la alta afinidad y la estabilidad sistémica de FET- β AG-TOCA, fue tranquilizador observar una buena localización del radiotrazador en el tumor. La **Figura 16a** muestra cortes de imagen de PET transversales y sagitales típicos a través de ratones que portan tumores AR42J que expresan sstr-2 que demuestran la localización de FET- β AG-TOCA en el tumor, riñón y vejiga/orina con alto contraste de señal a fondo. Por el contrario, no se observó localización de radiotrazadores en tumores y riñones de los ratones cuando se inyectó el péptido revuelto FET- β AG- [W-c- (CTFTYC) K] (**Figura 16b**). En este caso, la localización del trazador se observó principalmente en el cerebro, orina, hígado e intestinos (datos no mostrados). La farmacocinética comparativa de todos los análogos de [¹⁸F]fluoroetiltriazol-[Tyr³]octreotato en tumor, riñón, hígado, músculo y vejiga/orina se muestran en la **Figura 17**. La absorción de radiotrazadores en el tumor AR42J se caracterizó por un rápido aumento durante todo el periodo de exploración de 60 min. FET-G-TOCA tuvo la mayor absorción de tumores seguido de FET- β AG-TOCA, que tuvo una absorción más alta o comparable como [¹⁸F]-AIF-NOTA-OC. Estos trazadores fueron superiores al radiotrazador clínico, [⁶⁸Ga]-DOTATATE, con respecto a la absorción tumoral (**Tabla 6**). Enlazadores PEG, encarnado dentro de las estructuras de FET-G-PEG-TOCA y FETE-PEG-TOCA, absorción tumoral reducida (**Figura 17; Tabla 6**). La absorción no específica en el hígado fue en general baja (<7 % DI/ml) con FET- β AG-TOCA mostrando la absorción hepática más baja; FET-G-TOCA y FETE-PEG-TOCA mostraron la mayor absorción hepática. Los análogos de PEG-TOCA tuvieron el mayor aclaramiento urinario de acuerdo con su menor lipofilia. Lo perfiles cinéticos del radiotrazador en el riñón que también expresa sstr- (Bates, CM y col., *Kidney Int.* 2003;63:53-63) fueron diferentes de los de los tumores, sin embargo, la magnitud de la absorción fue mayor para los dos radiotrazadores, FET- β AG-TOCA y FET-G-TOCA; [¹⁸F]-AIF-NOTA-octreotida tuvo una absorción renal relativamente baja. La absorción muscular media fue <3 % DI/ml para todos los radiotrazadores. La absorción de radiotrazadores en el hueso fue baja para todos los análogos, lo que indica poca o ninguna defluoración. Se comparó la absorción de los radiotrazadores en los estudios de imágenes con el recuento directo de tejidos. Los perfiles estaban generalmente de acuerdo, pero la magnitud fue mayor para el recuento directo, consistente con el promedio de volumen parcial. La determinación directa de la radiactividad (recuento gamma) de solo una parte del tejido en comparación con el muestreo del tumor completo en el caso de las imágenes también podría haber llevado a diferencias sistemáticas.

30 **La absorción de FET- β AG-TOCA es específica.** Dada la alta absorción tumoral de los radiotrazadores, se evaluó la especificidad de la absorción *in vivo* utilizando FET- β AG-TOCA como [¹⁸F]fluoroetiltriazol- [Tyr³]octreotato prototípico. Se demostró que la absorción del radiotrazador era específica: i) De acuerdo con la pobre afinidad por sstr-2, el péptido mezclado radiomarcado, (FET- β AG- [W-c- (CTFTYC) K]), no mostró absorción tumoral detectable en el modelo AR42J *in vivo* (**Figura 18**).- La absorción de FET- β AG- [Wc- (CTFTYC) K] también fue baja en el tejido normal de alta expresión de sstr (riñones), y la absorción fue mayor. en hígado en comparación con FET- β AG-TOCA. ii) Para mostrar que la absorción tumoral del radiotrazador estaba mediada por el receptor, Los estudios de bloqueo se realizaron preinyectando ratones con un exceso de octreótido no marcado (equivalente molar de 100 veces) para saturar los sitios de unión a sstr. Esto dio como resultado una absorción 2 veces menor (por recuento directo) de FET- β AG-TOCA en xenoinjertos AR42J (**Figura 18; Tabla 6**). Después del bloqueo con octreotida no marcada, las concentraciones de radiactividad en riñón (solo puntos de tiempo temprano), e el músculo y, en menor medida, en el hígado aumentaron y la radioactividad urinaria disminuyó (**Figura 18**). iii) Se obtuvo evidencia adicional de la especificidad de la absorción de FET- β AG-TOCA por la baja absorción en xenoinjertos de HCT116 de baja expresión de sstr en comparación con los xenoinjertos AR42J (**Tabla 6**).

45 De forma interesante, la absorción tumoral de los compuestos FET-G-TOCA y FET- β AG-TOCA varió entre las más altas indicadas hasta la fecha y fue mayor que la de [⁶⁸Ga] -DOTA-TATE (**Tabla 6**), que se utiliza clínicamente. De manera similar, la absorción tumoral de los dos análogos de [¹⁸F]-fluoroetiltriazol-[Tyr³]octreotato fue significativamente mayor que los indicados para [¹¹¹In] -DTPA-octreotida por Froidevaux y col., (3,03 \pm 0,26 % DI/g) en el mismo modelo de tumor (Froidevaux, S., y col., *Endocrinology.* 2000;141:3304-3312). Los trazadores también mostraron una absorción similar o mayor en comparación con [¹⁸F]-AIF-NOTA-OC. En contraste con la alta absorción tumoral de FET-G-TOCA y FET- β AG-TOCA, los dos análogos PEGilados mostraron una menor absorción de tumor (y riñón). Este fue un hallazgo inesperado dado que la PEGilación de péptidos a menudo aumenta la vida media y generalmente reduce la eliminación general del cuerpo (Veronese, F.M., y col., *Drug Discov Today.* 2005;10:1451-1458). Este hallazgo puede explicarse en parte por el hecho de que una de las propiedades de la PEGilación es también hacer que la molécula sea más soluble en agua (Veronese, F.M., y col., *BioDrugs.* 2008; 22: 315-329), lo que apoya una eliminación más rápida de la circulación en comparación con los análogos menos hidrofílicos no PEGilados; respaldado por un alto aclaramiento urinario (**Figura 17f**). La baja absorción de los análogos de PEG-TOCA también podría explicarse por su menor afinidad *in vitro* (**Figura 14**).

60 Se predijo que tejidos como el hígado y los músculos que carecían de expresión del receptor (Reynaert, H., y col., *Gut.* 2004;53: 1180-1189) mostrará una baja absorción de los radiotrazadores. Los análogos de PEG-TOCA mostraron una menor absorción de tejidos no objetivo. Es probable que la mayor hidrofiliencia resultante de la PEGilación en esta serie conduzca a una eliminación más rápida de los tejidos no diana. El curso temporal de los estudios PET permitió cuantificar este efecto. De forma interesante, FET- β AG-TOCA con hidrofiliencia intermedia en comparación con los análogos PEGilados (**Tabla 6**), mostraron una absorción baja similar en tejidos no diana, incluyendo hígado y

músculo. Este es un atributo positivo de FET-βAG-TOCA que no se realizó en FET-G-TOCA, que tuvo la mayor absorción tumoral.

Pruebas de imagen

5 Un análogo de [Tyr³]octreotato unido a triazol o un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención puede usarse como un radiotrazador o un agente de imagen para aquellos estados de enfermedad o tumores que exhiben niveles elevados o altos de somatostatina receptores.

10 En una realización, un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención puede usarse como un radiotrazador PET para aquellos estados de enfermedad o tumores que exhiben niveles elevados o elevados de receptores de somatostatina. En una realización, un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención puede usarse como un radiotrazador PET que es útil para la detección *in vivo* de tumores neuroendocrinos que se sabe que expresan niveles elevados de receptores de somatostatina. En una realización, un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención puede usarse como un radiotrazador de PET que es útil para la detección de tumores de pulmón que expresan altos niveles de receptores de somatostatina.

15 Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un procedimiento de imagen PET para determinar la distribución y/o la extensión de un estado de enfermedad o un tumor que exhibe niveles aumentados o altos de receptores de somatostatina, en el que dicho procedimiento comprende:

- i) administrar a dicho sujeto un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención como se describe en el presente documento;
- 20 ii) permitir que dicho análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se una a los receptores de somatostatina en dicho sujeto;
- iii) detectar señales emitidas por el ¹⁸F comprendido en dicho análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención: y
- iv) generar una imagen representativa de la localización y/o cantidad de dichas señales.

25 El procedimiento opcionalmente comprende además la etapa de determinar la distribución y extensión del estado de la enfermedad en dicho sujeto en el que dicha distribución y extensión del estado de la enfermedad está directamente correlacionadas con dichas señales.

30 La presente invención también proporciona el uso de uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para la producción de un agente de formación de imágenes. La invención proporciona además un agente de formación de imágenes que comprende un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención.

35 La invención también proporciona el uso de uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para la producción de un agente para detectar un estado de enfermedad o tumor que exhiba niveles altos o aumentados de receptores de somatostatina *in vivo* en un sujeto. La invención proporciona adicionalmente uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para su uso en detectar un estado de enfermedad o tumor que exhiba niveles altos o aumentados de receptores de somatostatina *in vivo* en un sujeto.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento de imagen PET para determinar la distribución y/o la extensión de uno o múltiples tumores neuroendocrinos en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende:

- i) administrar a dicho sujeto un análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención como se describe en el presente documento;
- 40 ii) permitir que dicho análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se una a los receptores de somatostatina sobre la superficie de dicho o dichos tumores neuroendocrinos en dicho sujeto;
- iii) detectar señales emitidas por ¹⁸F comprendido en dicho análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención; y
- iv) generar una imagen representativa de la localización y/o cantidad de dichas señales.

45 El procedimiento opcionalmente comprende además la etapa de determinar la distribución y extensión de tumor(es) neuroendocrinos en dicho sujeto en el que dicha distribución y extensión de tumor(es) neuroendocrinos está directamente correlacionada con dichas señales.

50 La presente invención proporciona el uso de uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para la producción de un agente para detectar uno o más tumores neuroendocrinos *in vivo* en un sujeto. La invención también proporciona uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para su uso en la detección de uno o más tumores neuroendocrinos *in vivo* en un sujeto.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento de imagen PET para determinar la distribución y/o la extensión de uno o múltiples tumores de pulmón en un sujeto, en el que dicho procedimiento comprende:

- i) administrar a dicho sujeto un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención como se describe en el presente documento;
- ii) permitir que dicho análogo o análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se una a los receptores de somatostatina en la superficie del tumor o tumores de pulmón en dicho sujeto;
- 5 iii) detectar señales emitidas por el ¹⁸F comprendido en dicho análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención; y
- iv) generar una imagen representativa de la localización y/o cantidad de dichas señales.

El procedimiento opcionalmente comprende además la etapa de determinar la distribución y extensión de tumor (es) pulmonar (es) en dicho sujeto en el quedicha distribución y extensión de tumor (es) pulmonar (es) está directamente correlacionada con dichas señales.

La presente invención proporciona el uso de uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para la producción de un agente para detectar uno o más tumores de pulmón *in vivo* en un sujeto. La presente invención también proporciona uno o más análogos de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención para su uso en la detección de uno o más tumores de pulmón *in vivo* en un sujeto.

La etapa de "administrar" el análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se lleva a cabo, preferentemente, por vía parenteral, y lo más preferentemente por vía intravenosa. La ruta intravenosa representa la forma más eficiente de administrar el análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención en todo el cuerpo del sujeto. La administración intravenosa no representa una intervención física sustancial ni un riesgo sustancial para la salud del sujeto. El análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se administra, preferentemente, como la composición radiofarmacéutica de la invención, como se define en el presente documento. La etapa de administración no es necesaria para una definición completa del procedimiento de imagen de PET de la invención. Como tal, también puede entenderse que el procedimiento de imagen PET de la invención comprende las etapas (ii)-(v) definidas anteriormente llevadas a cabo en un sujeto al que se ha administrado previamente el análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención.

Tras la etapa de administración y antes de la etapa de detección, se deja que el análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se una al receptor o receptores de somatostatina. Por ejemplo, cuando el sujeto es un mamífero intacto, el análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención se moverá de forma dinámica a través del cuerpo del mamífero, entrando en contacto con diversos tejidos en el mismo. Una vez que el análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención entra en contacto con el o los receptores de somatostatina, tiene lugar una interacción específica de tal manera que la eliminación del análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención del tejido con el o los receptores de somatostatina requiere más tiempo que el tejido sin receptores o con menos receptores de somatostatina. Se alcanzará un cierto punto en el tiempo cuando la detección del análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención específicamente unido a los receptores de somatostatina se habilita como resultado de la relación entre el radiotrazador de PET unido al tejido con receptor o receptores de somatostatina frente al unido a tejido sin o con menos receptores de somatostatina.

La etapa de "detección" del procedimiento de la invención implica la detección de señales emitidas por el ¹⁸F comprendido en el análogo de análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetiltriazol de la invención por medio de un detector sensible a dichas señales, es decir, una cámara PET. Esta etapa de detección también puede entenderse como la adquisición de datos de señal.

La etapa de "generación" del procedimiento de la invención se lleva a cabo por un ordenador que aplica un algoritmo de reconstrucción a los datos de la señal adquirida para producir un conjunto de datos. Este conjunto de datos se manipula para generar imágenes que muestran la ubicación y/o la cantidad de señales emitidas por el ¹⁸F. Las señales emitidas se correlacionan directamente con la expresión de los receptores de somatostatina de manera que la etapa de "determinación" se puede realizar evaluando la imagen generada.

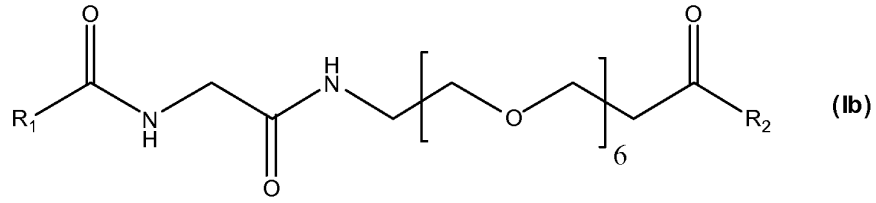
El "sujeto" de la invención puede ser cualquier sujeto humano o animal. Preferentemente, el sujeto de la invención es un mamífero. Más preferentemente, dicho sujeto es un cuerpo de mamífero intacto *in vivo*. En una realización especialmente preferida, el sujeto de la invención es un ser humano. El procedimiento de imagen *in vivo* puede usarse para estudiar los receptores de somatostatina en sujetos sanos, o en sujetos que se sabe o se sospecha que tienen una afección patológica asociada con la expresión anormal de los receptores de somatostatina.

En una realización alternativa, el procedimiento de imagen PET de la invención puede llevarse a cabo repetidamente durante el curso de un régimen de tratamiento para dicho sujeto, comprendiendo dicho régimen la administración de un fármaco para combatir un tumor neuroendocrino. Por ejemplo, el procedimiento de imagen de PET de la invención puede llevarse a cabo antes, durante y después del tratamiento con un medicamento para combatir un tumor neuroendocrino. De esta forma, el efecto de dicho tratamiento puede controlarse en el tiempo. El PET es particularmente adecuado para esta aplicación, ya que tiene una excelente sensibilidad y resolución, de modo que se pueden observar en el tiempo incluso cambios relativamente pequeños en una lesión, una ventaja particular para el seguimiento del tratamiento.

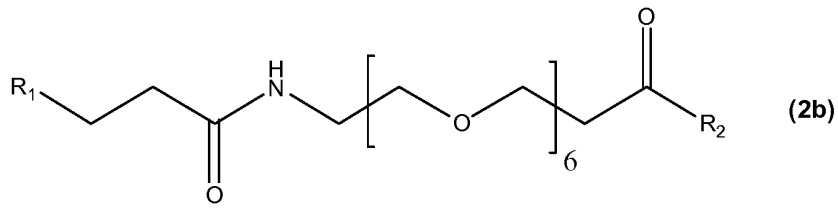
REIVINDICACIONES

1. Un análogo de [Tyr³]octreotato unido a 2-[¹⁸F]fluoroetilriazol seleccionado del grupo que consiste en:

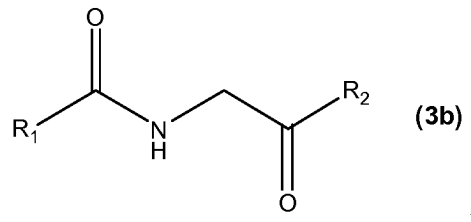
FET-G-PEG-TOCA, de Fórmula (1b):



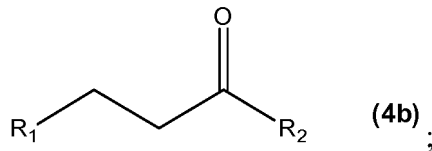
5 FETE-PEG-TOCA, de Fórmula (2b):



FET-G-TOCA (3b):

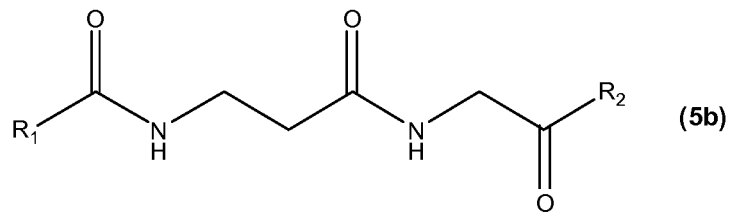


FETE-TOCA (4b):



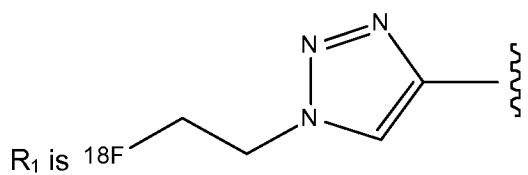
10

y
FET-βAG-TOCA (5b):

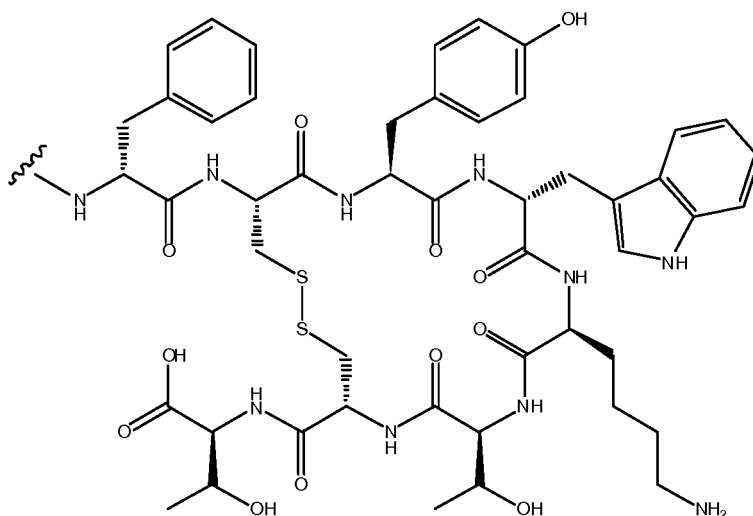


en el que para cada uno de los compuestos anteriores:

15

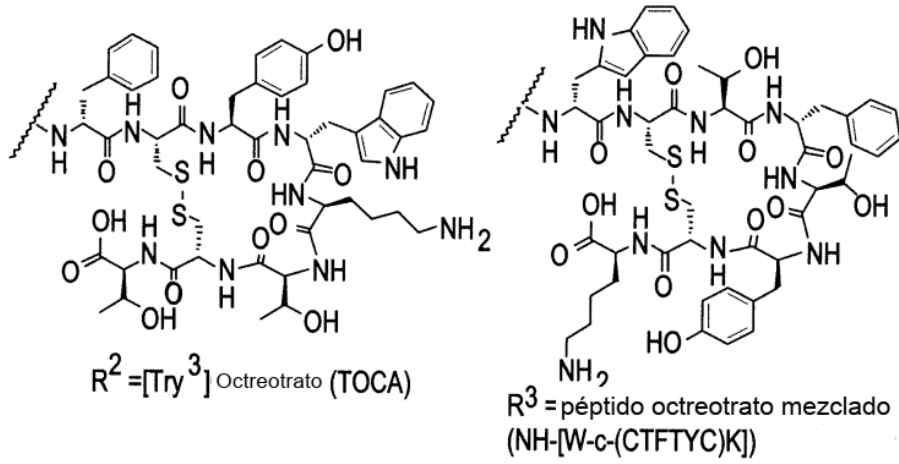


y
R₂ tiene la estructura siguiente:



2. Una composición farmacéutica, que comprende al menos un compuesto de la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o vehículo biocompatible farmacéuticamente aceptable.
3. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de un agente de formación de imágenes.
- 5 4. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de un agente para detectar un estado de enfermedad o un tumor que exhibe niveles aumentados o altos de receptores de somatostatina *in vivo* en un sujeto.
5. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de un agente para detectar tumor(es) neuroendocrino(s) *in vivo* en un sujeto.
- 10 6. Uso de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para la producción de un agente para detectar tumor(es) pulmonare(s) *in vivo* en un sujeto.
7. Un agente de formación de imágenes, que comprende un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1.
8. un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la detección de un estado de enfermedad o un tumor que exhibe niveles aumentados o altos de receptores de somatostatina *in vivo* en un sujeto.
- 15 9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la detección de tumor(es) neuroendocrino(s) *in vivo* en un sujeto.
10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la detección de tumor(es) pulmonare(s) *in vivo* en un sujeto.

FIG. 1



	R ¹ =	
	$\text{H} \equiv \text{---}$	
	G-PEG-TOCA (1a)	FET-G-PEG-TOCA (1b)
	E-PEG-TOCA (2a)	FETE-PEG-TOCA (2b)
	G-TOCA (3a)	FET - G-TOCA (3b)
	E-TOCA (4a)	FETE-TOCA (4b)
	β AG-TOCA (5a)	FET- β AG-TOCA (5b)
	β AG-[W-c-(CTFTYC)K] (6a)	FET- β AG-[W-c-(CTFTYC)K] (6b)

FIG. 1A

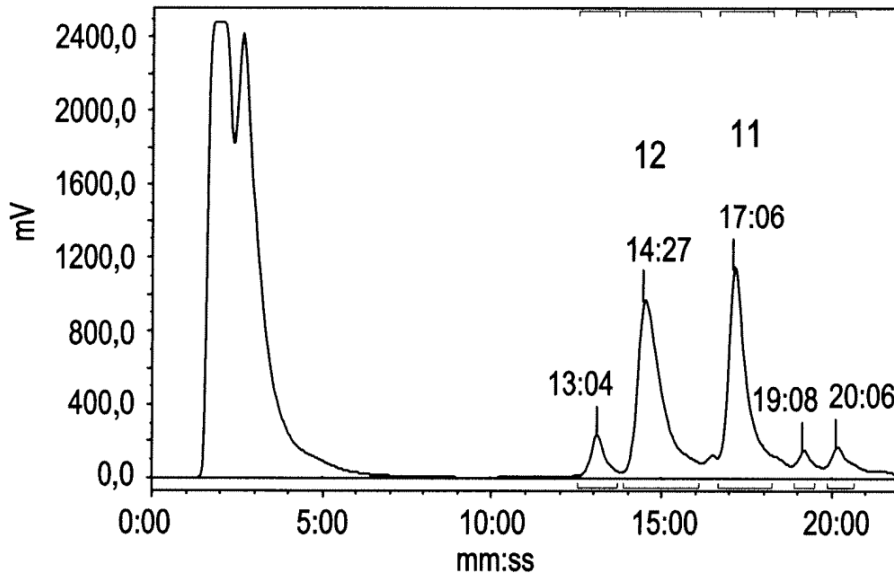
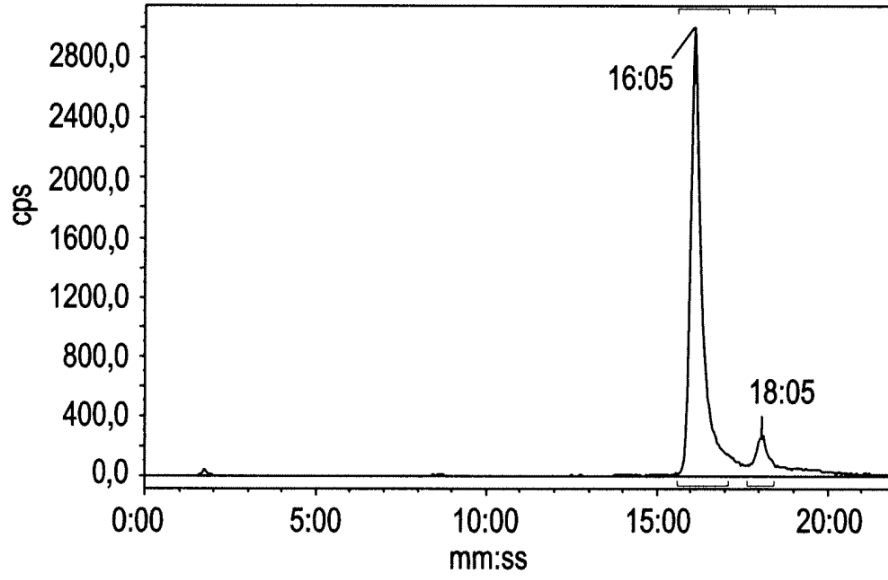


FIG. 2

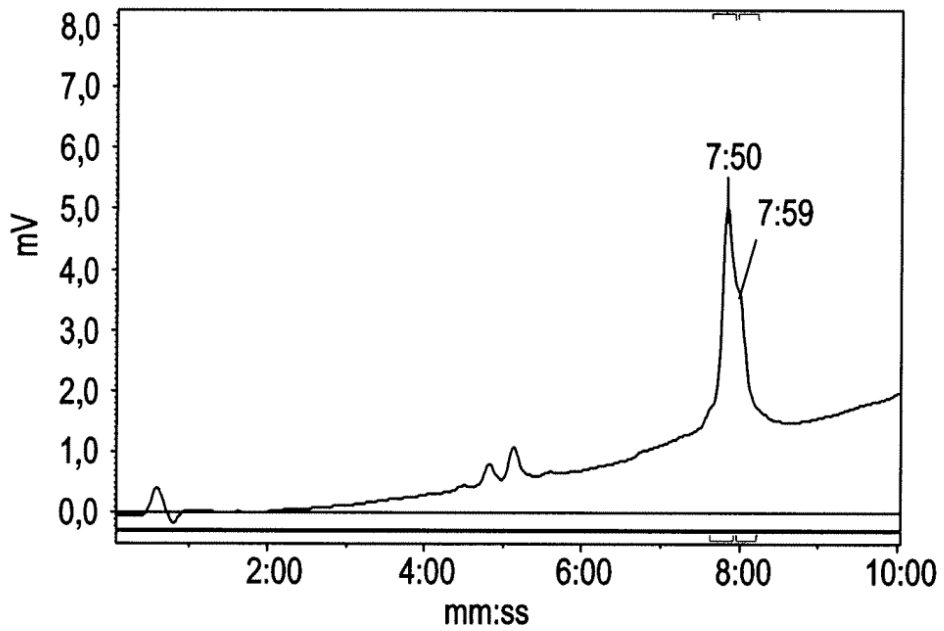
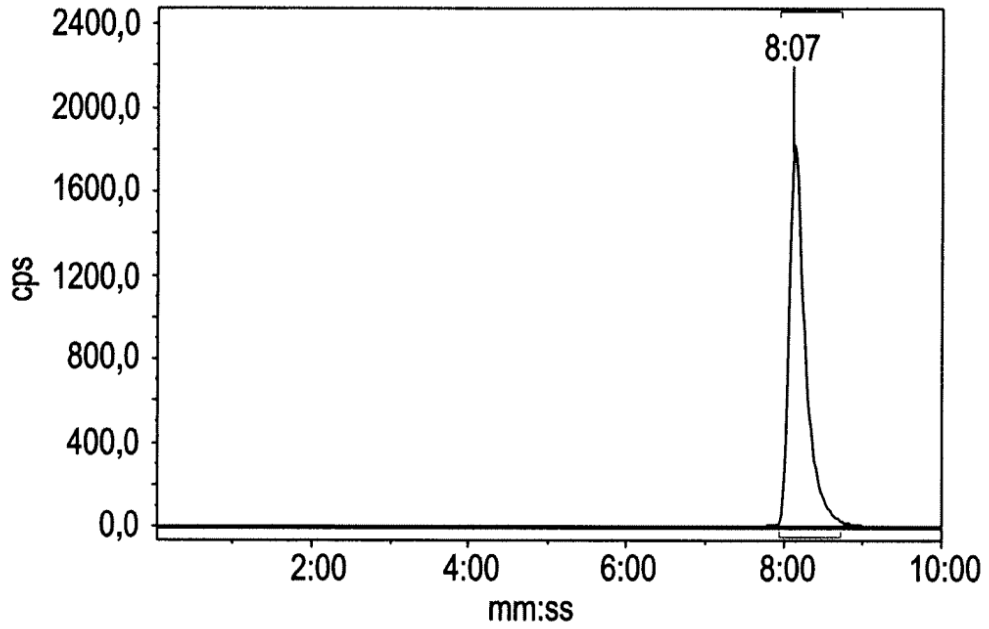


FIG. 3

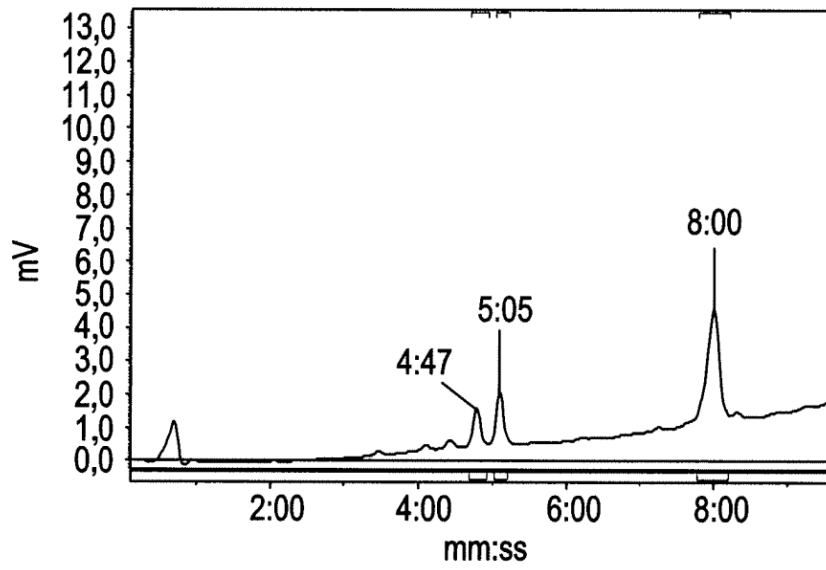
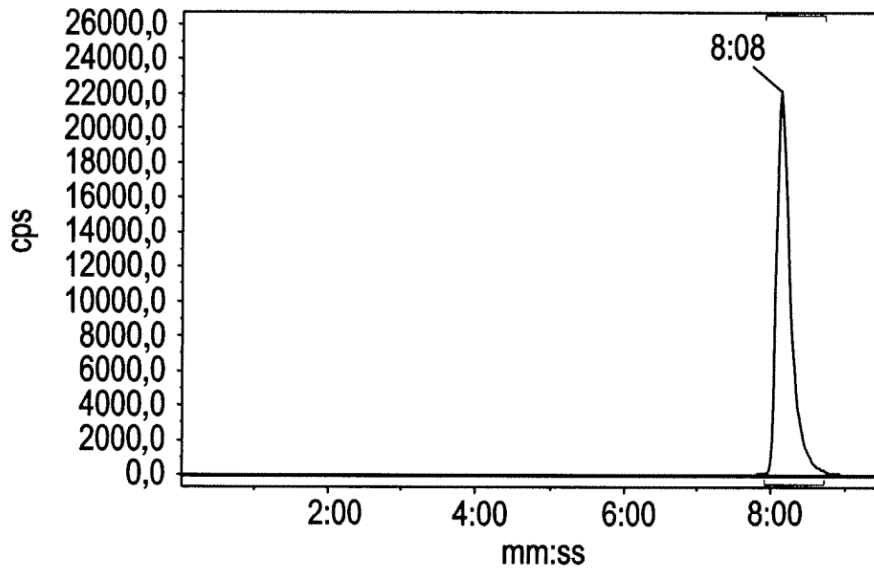


FIG. 4

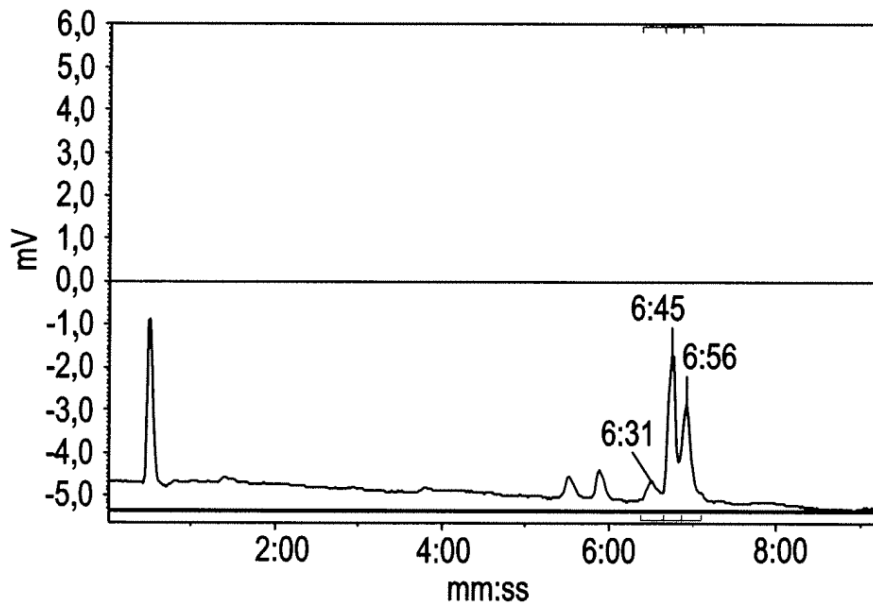
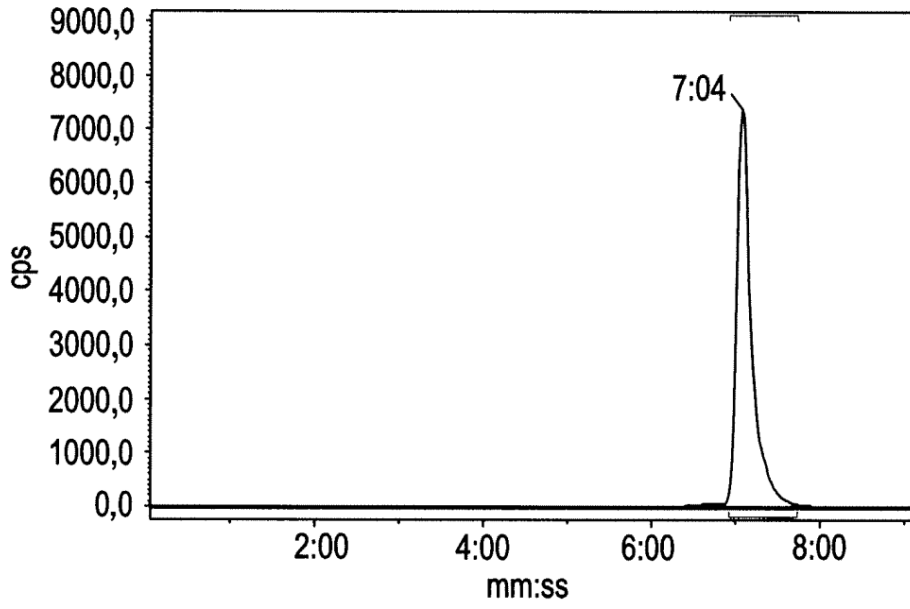


FIG. 5

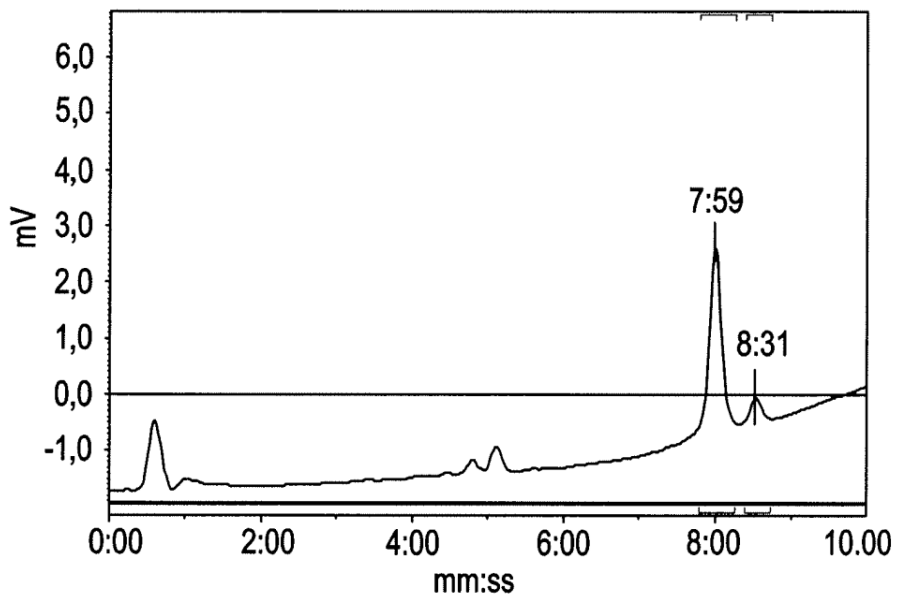
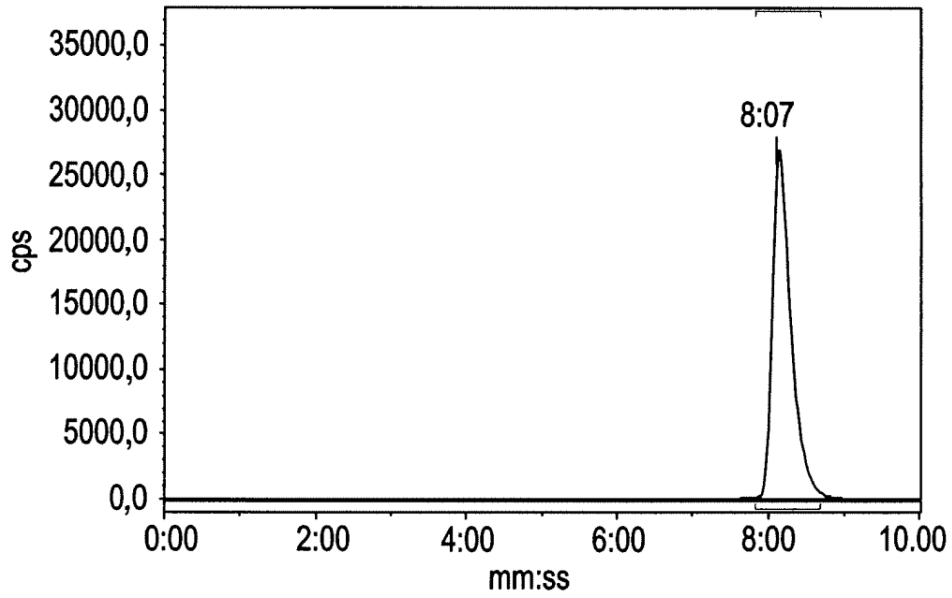


FIG. 6

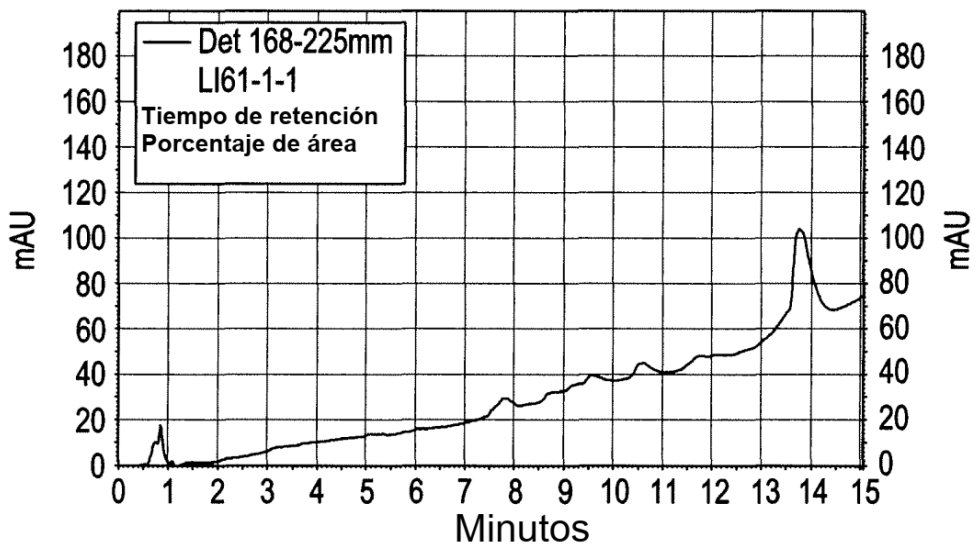
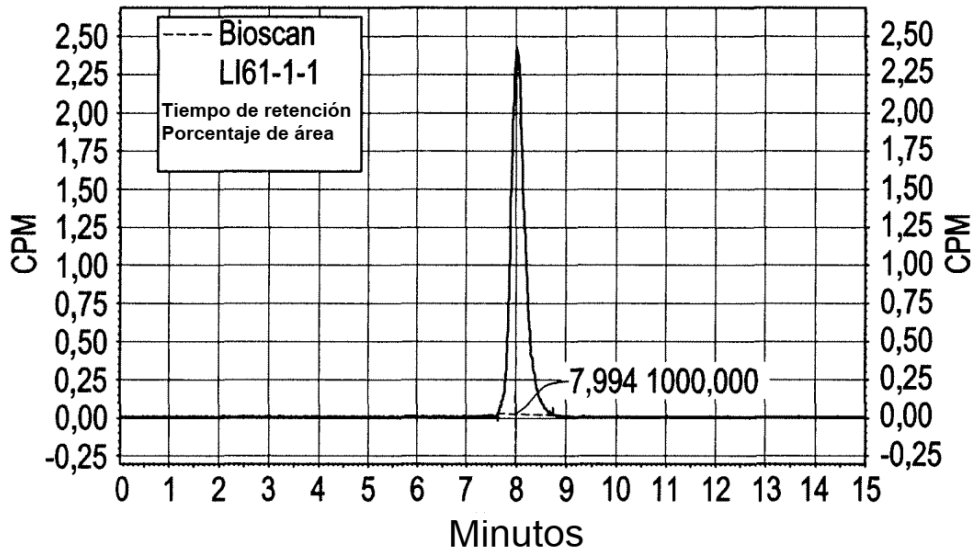


FIG. 7

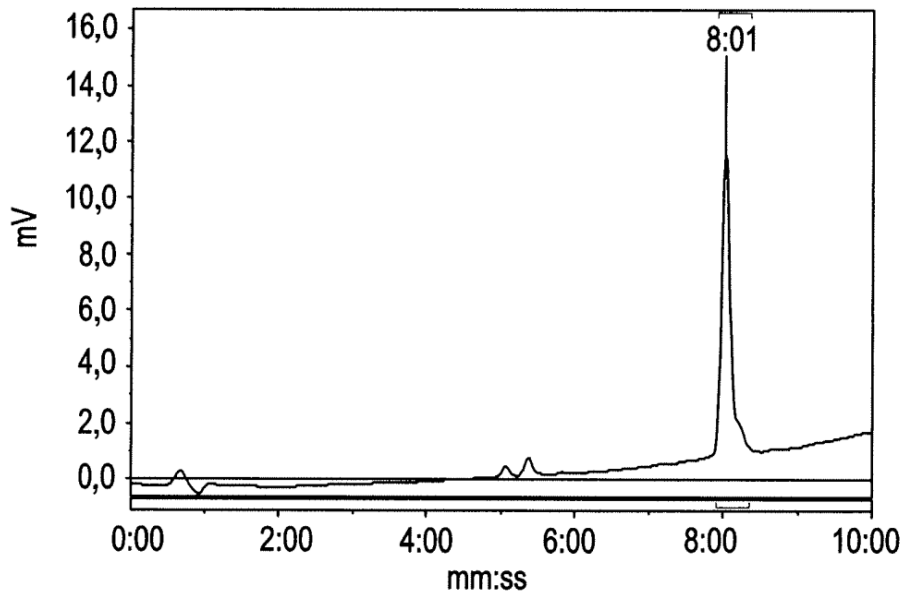
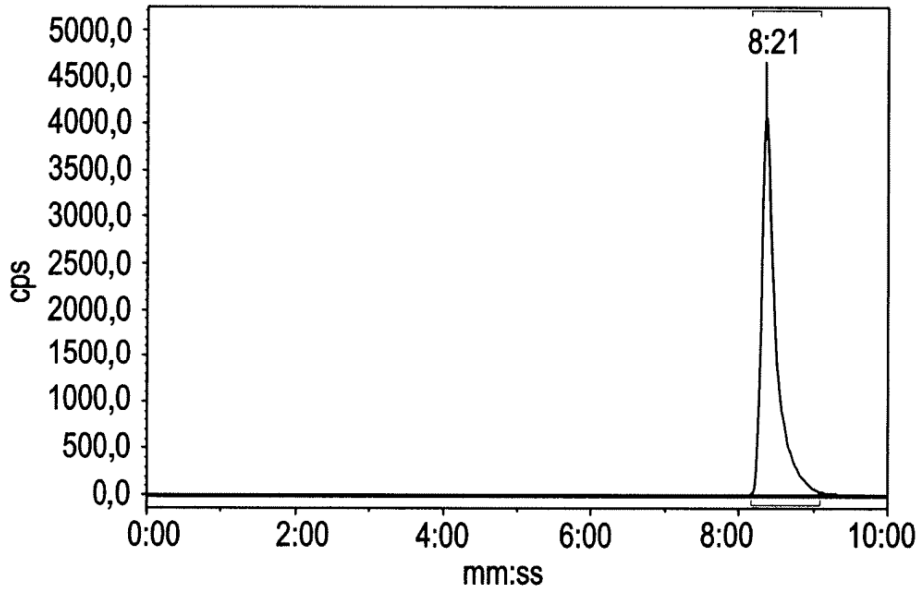


FIG. 8

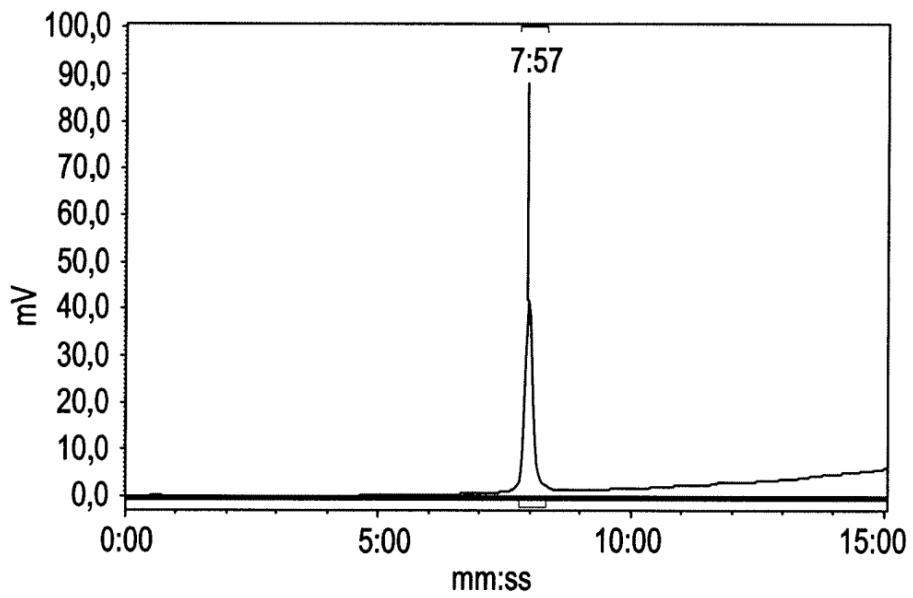
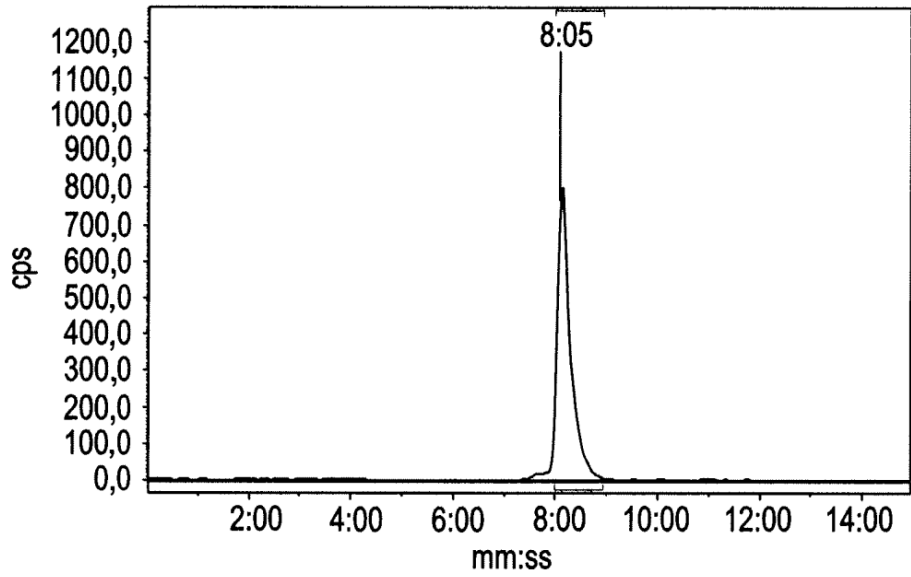


FIG. 9

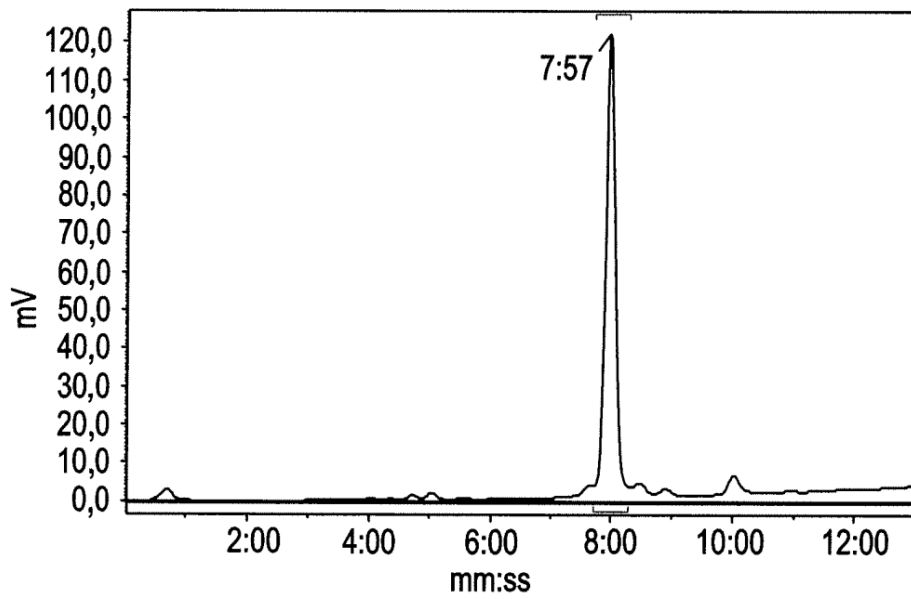
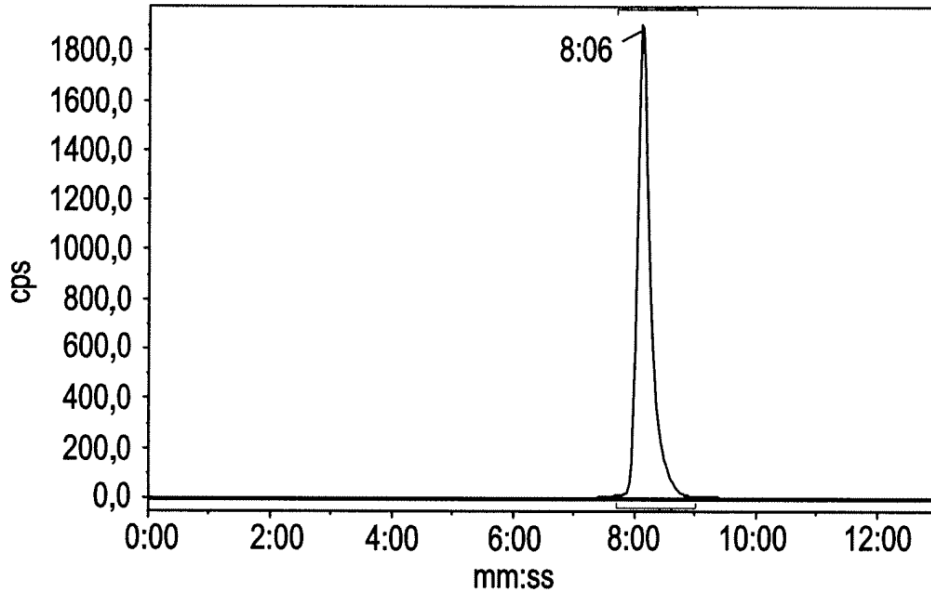


FIG. 10

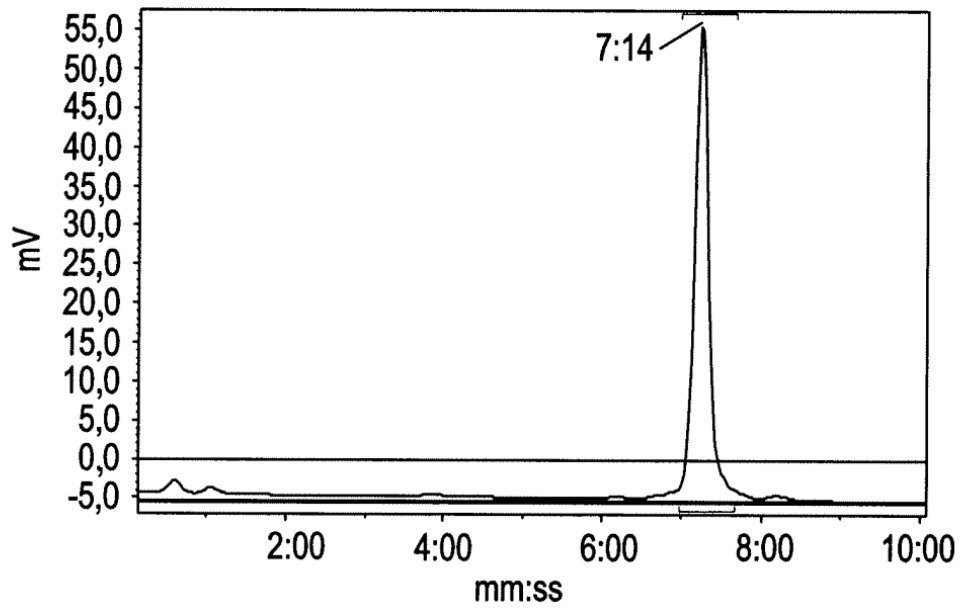
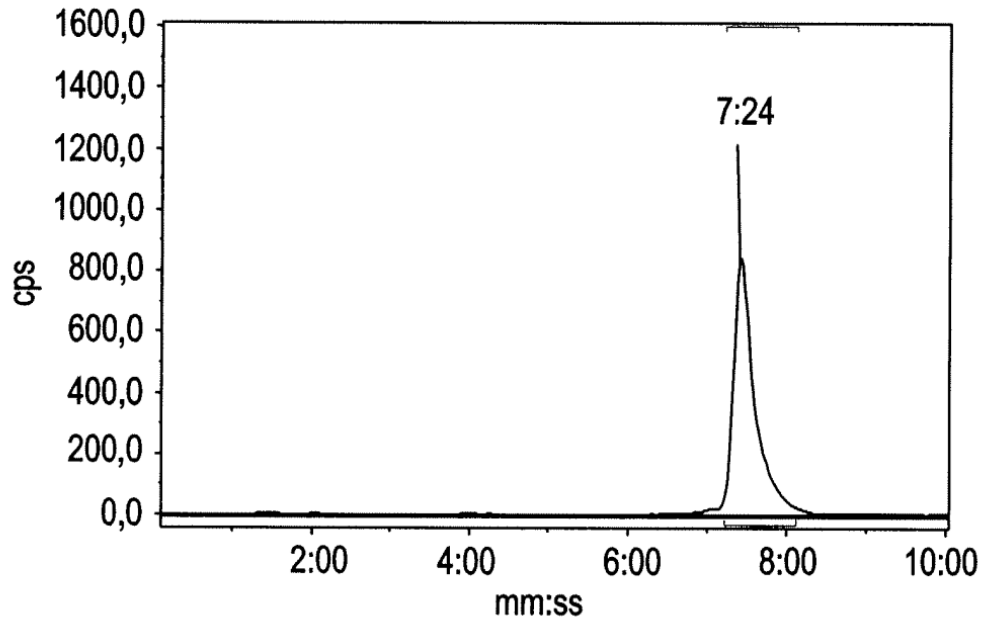


FIG. 11

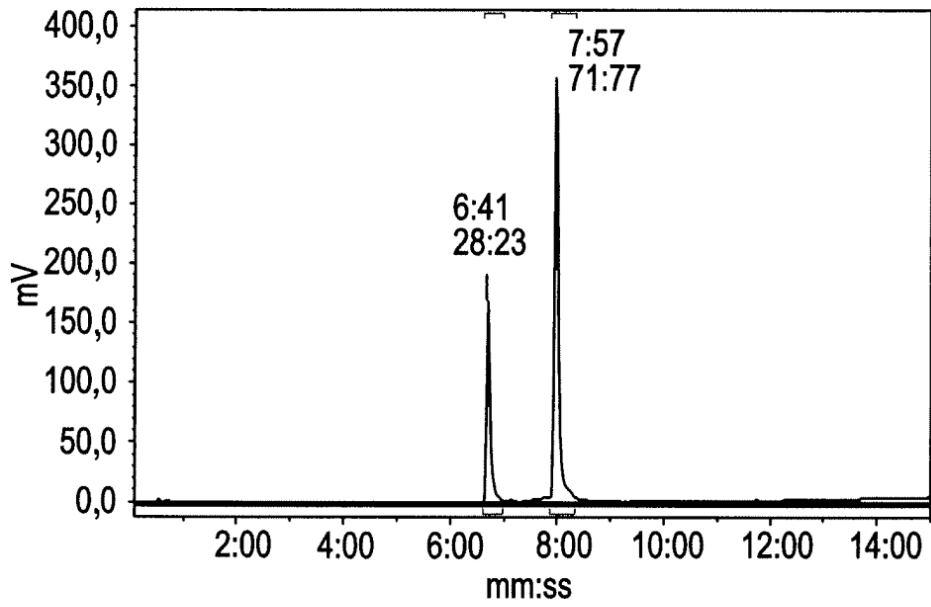
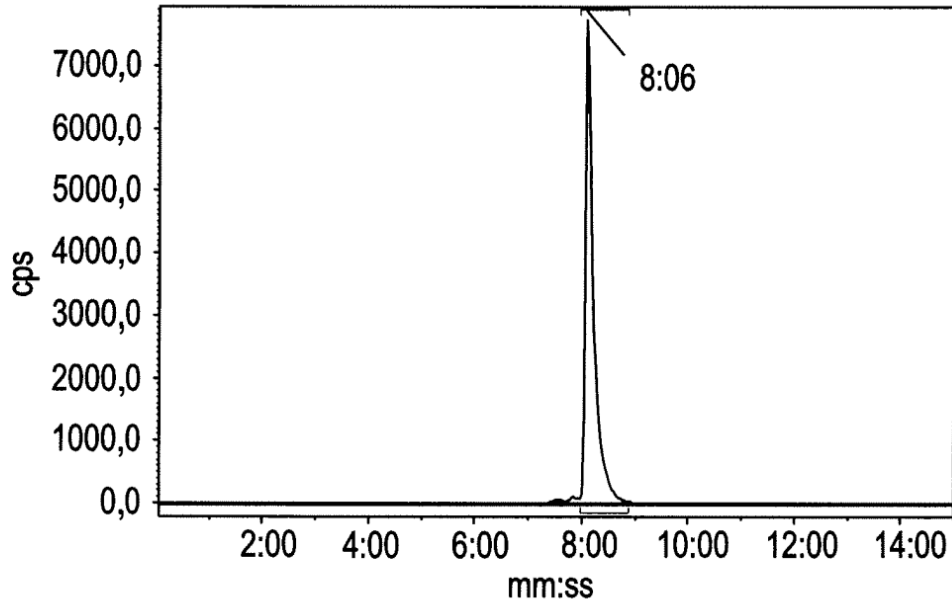


FIG. 12

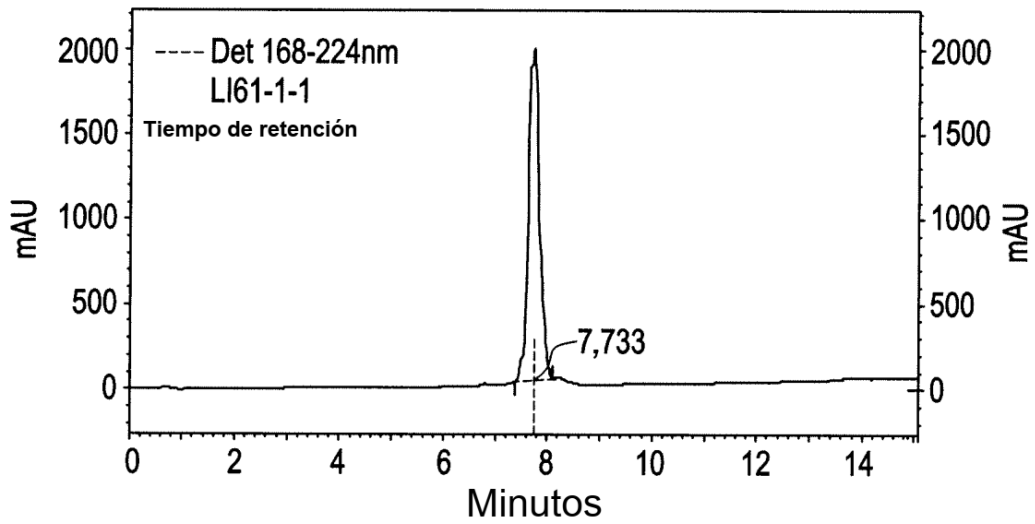
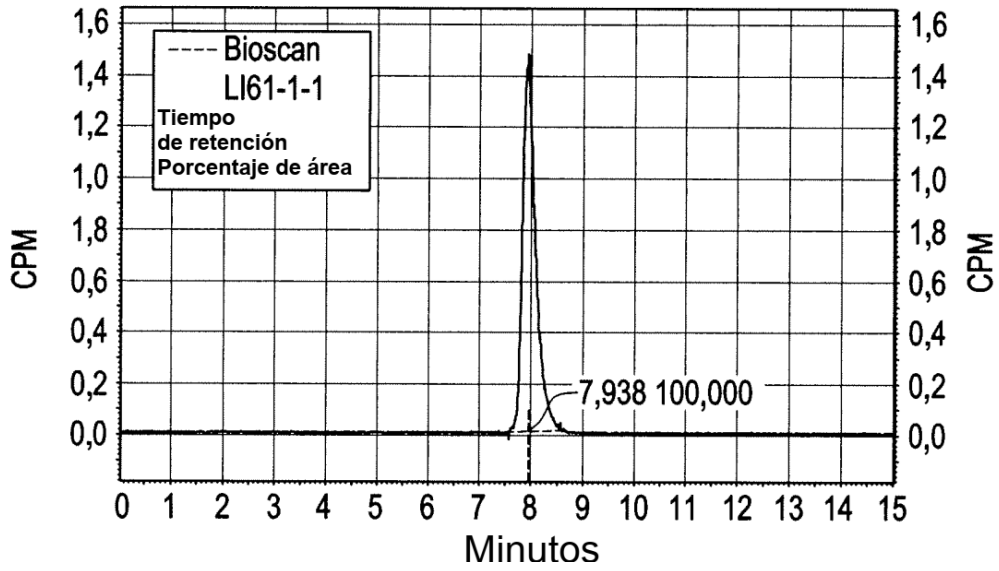


FIG. 13

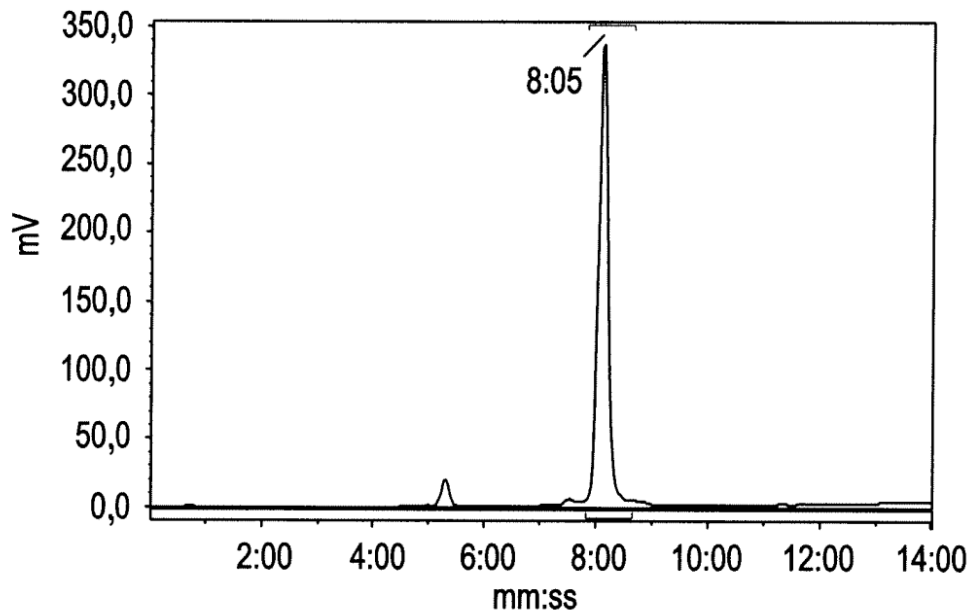
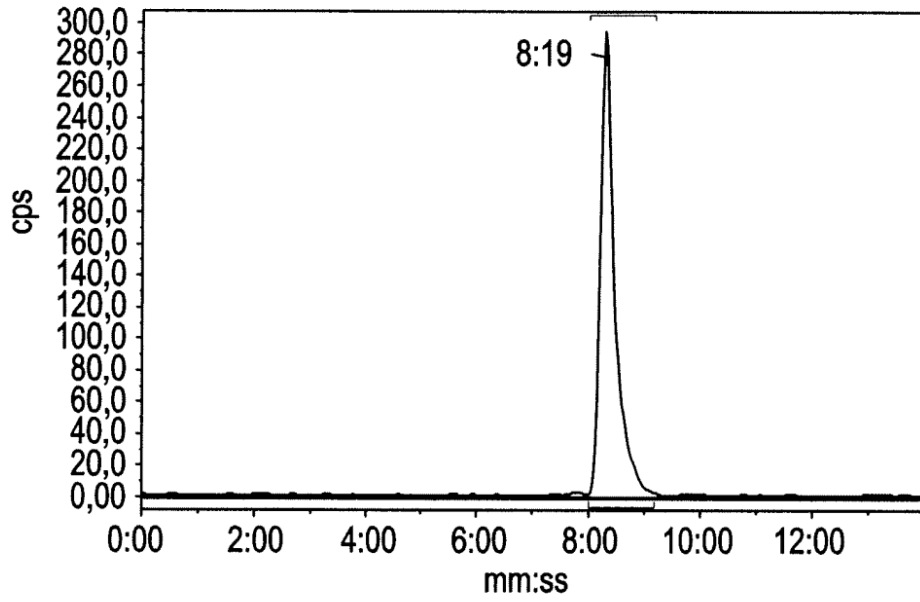
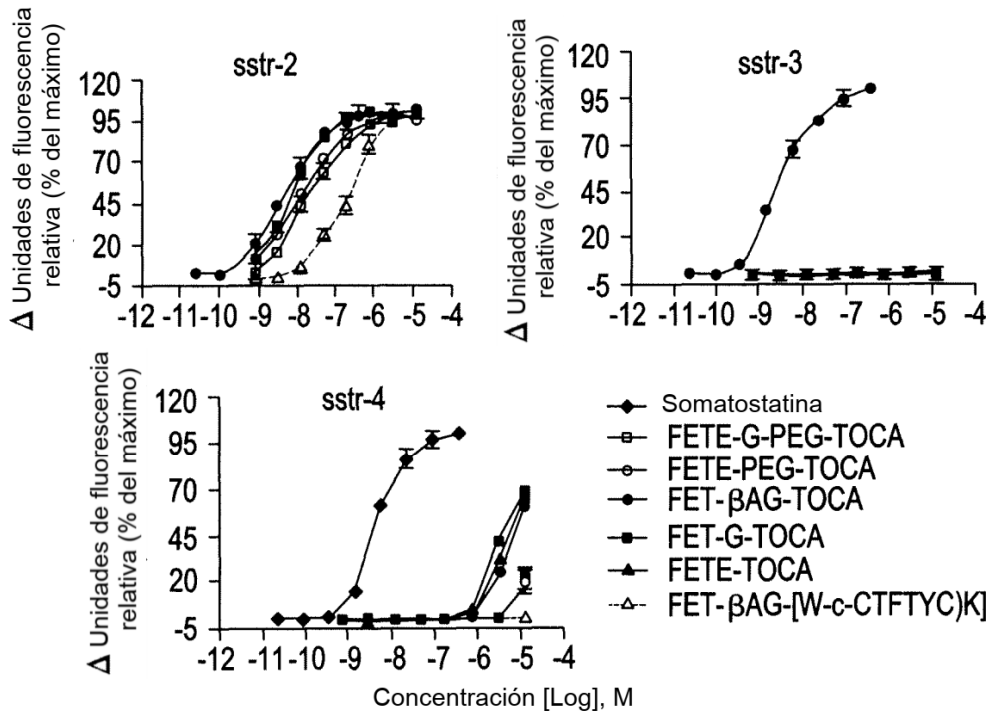


FIG. 14



Identidad del compuesto	Valor de potencia CE ₅₀ del agonista predicho (nM)		
	sstr-2	sstr-3	sstr-4
Somatostatina	5,6 nM	9,7 nM	3,8 nM
FET-G-PEG-TOCA	19,0 nM	ND	>10 mM
FETE-PEG-TOCA	12,0 nM	ND	>10 mM
FET-βAG-TOCA	4,7 nM	ND	8,6 mM
FET-G-TOCA	6,9 nM	ND	5,4 mM
FETE-TOCA	4,1 nM	ND	6,5 mM
FET-βAG-[W-c-CTFTYC)K]	220 nM	ND	ND

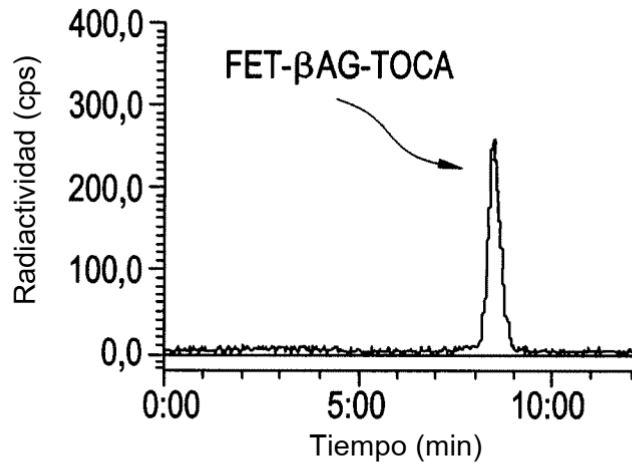


FIG. 15B

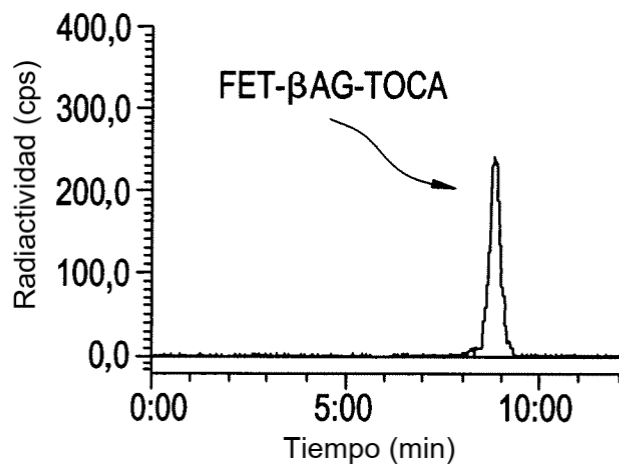


FIG. 16A

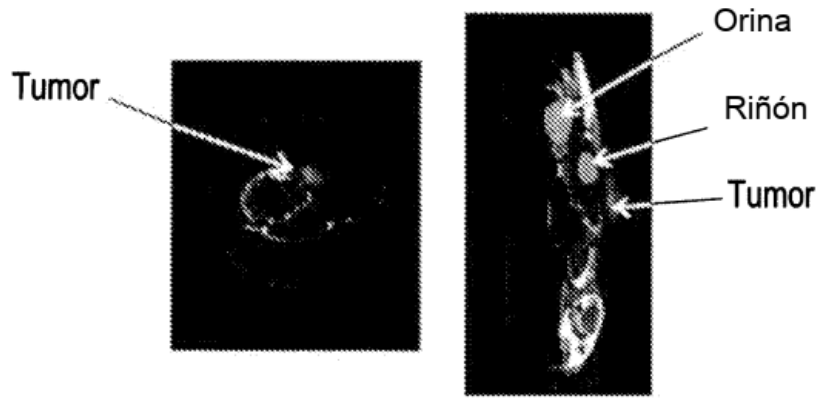


FIG. 16B

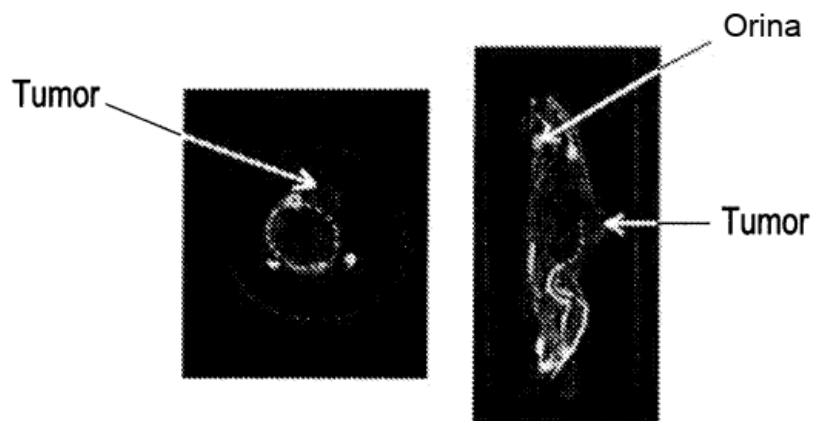


FIG. 17A

Tumor

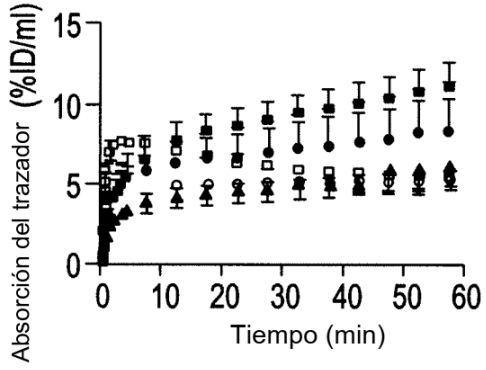


FIG. 17B

Riñón

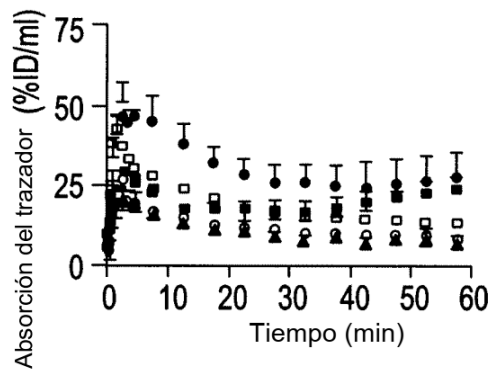


FIG. 17C

Hígado

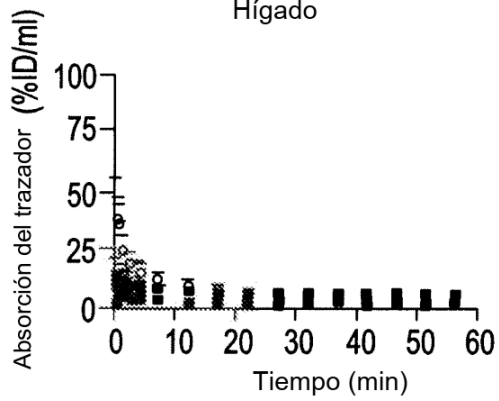


FIG. 17D

Hígado (zoom)

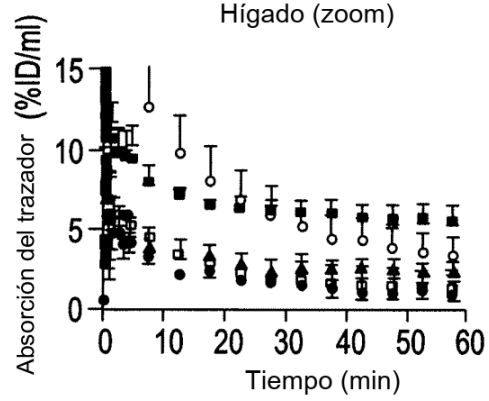


FIG. 17E

Músculo

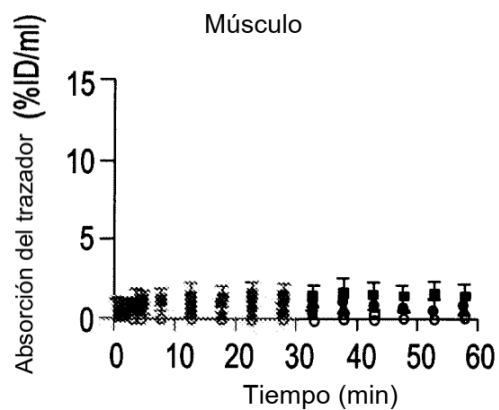


FIG. 17F

Orina

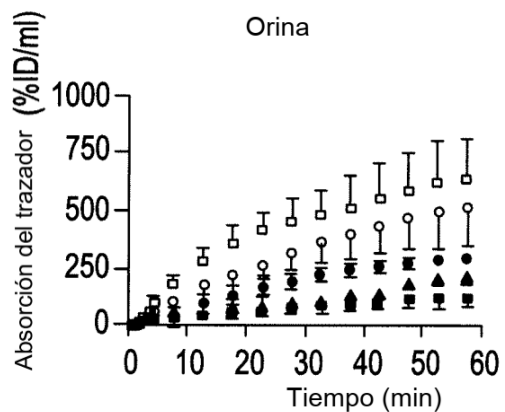


FIG. 18A

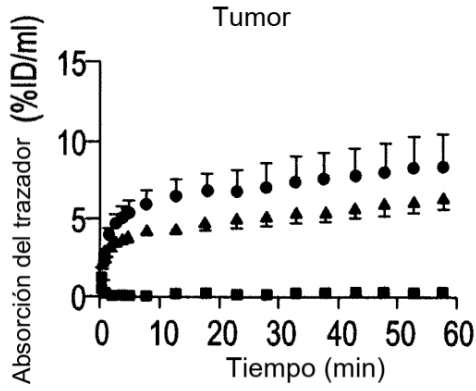


FIG. 18B

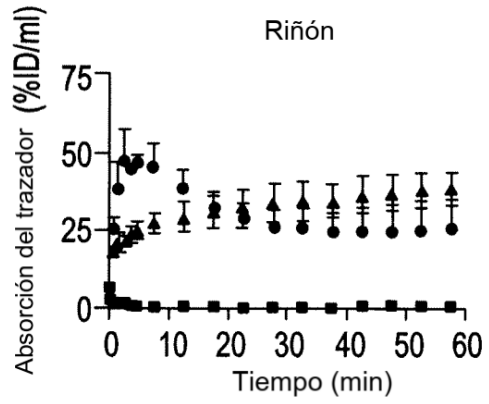


FIG. 18C

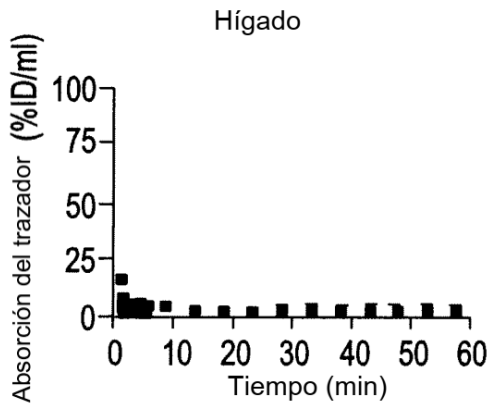


FIG. 18D

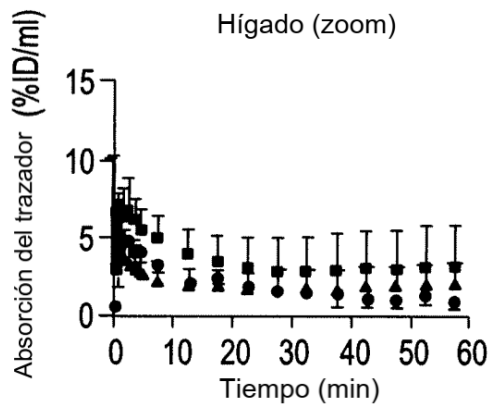


FIG. 18E

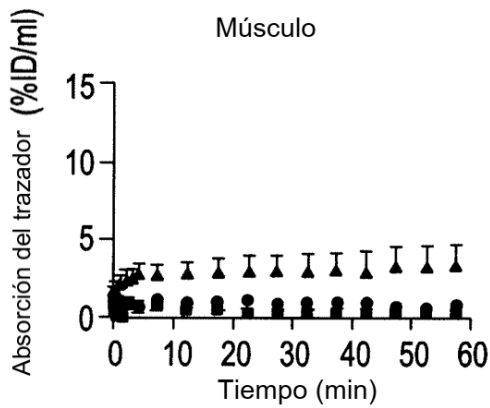


FIG. 18F

